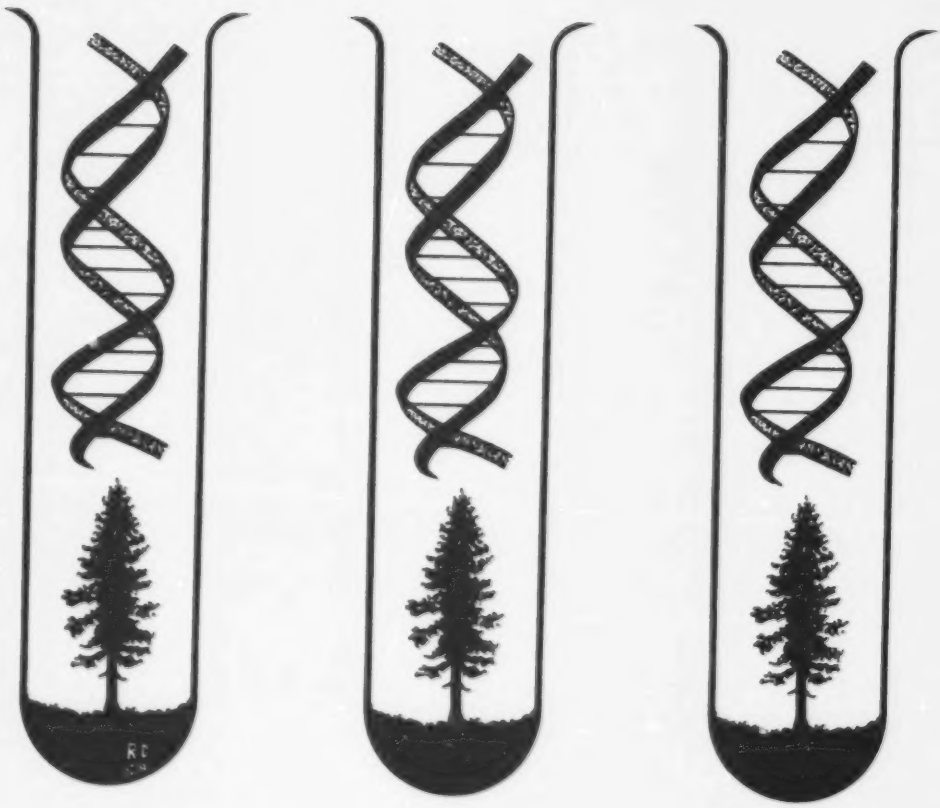
Forêts Canada Forestry Canada

Procédés de création de banques d'ADNc de tissus de conifères

J.A. Pitel et W.M. Cheliak

Rapport d'information PI-X-95F
Institut forestier national de Petawawa



91-00352/

INSTITUT FORESTIER NATIONAL DE PETAWAWA

Le mandat de l'Institut forestier national de Petawawa, comme celui des autres établissements de Forêts Canada, est de promouvoir une meilleure gestion et une utilisation plus rationnelle des ressources forestières du Canada, pour le bien économique et social de tous les Canadiens. Les objectifs des activités des programmes menés à l'Institut appuient ce mandat à travers la découverte, le développement, la démonstration, l'application et le transfert des innovations. En tant qu'institut national, il doit s'attacher à des problèmes qui débordent le cadre régional ou qui nécessitent des compétences particulières de même qu'un équipement non disponible aux installations régionales de Forêts Canada. La plupart du temps, les recherches sont effectuées en étroite collaboration avec le personnel des centres régionaux, des services forestiers des provinces et de l'industrie forestière.

Les travaux de recherche et les services techniques de l'Institut sont regroupés autour de cinq principales activités:

GÉNÉTIQUE FORESTIÈRE ET BIOTECHNOLOGIE — Ce programme encadre des études sur la génétique forestière, la microbiologie, la micropropagation, la génétique moléculaire et la recherche sur les semences. Il comprend également les services à là clientèle et la banque de semences du Centre national de semences forestières. Lié à plusieurs organismes internationaux, ce centre existe depuis longtemps.

SYSTÈMES D'AMÉNAGEMENT FORESTIER — Ce programme intègre en recherche et développement des opérations concernant les incendies de forêt, la télédétection, la météorologie, la modélisation, la croissance, la récolte et le RIMA. Il permet ainsi l'élaboration et la démonstration de systèmes d'aménagement forestier.

STATISTIQUES NATIONALES SUR LES RESSOURCES FORESTIÈRES — Ce programme fournit les renseignements biologiques, techniques et socio-économiques sur les ressources forestières du Canada. Il vise le développement des bases de données et l'établissement de nouveaux logiciels et bases de données pour aider à l'élaboration des politiques forestières. Le Programme d'inventaire forestier recueille l'information sur les forêts au niveau national, maintient le Système sur les ressources forestières canadiennes et prépare l'inventaire des forêts du Canada.

COMMUNICATIONS — Ce programme regroupe les services offerts par la bibliothèque, les travaux touchant la sensibilisation du public, les renseignements, la rédaction-révision et les publications. L'Institut reçoit plus de 20 000 visiteurs chaque année. Le Centre d'accueil, des visites autoguidées et un programme éducatif complet sont ouverts à tous. C'est à l'IFNP que l'on trouve l'entrepôt et le centre de distribution national de toutes les publications scientifiques de Forêts Canada.

LA FORÊT EXPÉRIMENTALE — Outre des peuplements naturels où l'on applique divers traitements dans le cadre des plans de recherche en sylviculture, la Forêt de Petawawa, mesurant 100 km^2, comprend de vastes superficies de plantations âgées de plus de 60 ans. Les plantations expérimentales livrent des données sur la croissance et la récolte à la suite des expériences de culture. Elles fournissent aussi du matériel génétique dont le lignage est répertorié et qui se révèlent de plus en plus utiles pour les études sur la micropropagation et la génétique moléculaire. C'est un lieu par excellence pour mettre à l'essai des stratégies d'aménagement forestier à court et à long termes.

PROCÉDÉS DE CRÉATION DE BANQUES D'ADNc DE TISSUS DE CONIFÈRES

J.A. Pitel et W.M. Cheliak

Rapport d'information PI-X-95F
Institut forestier national de Petawawa
Forêts Canada
1990

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada, 1990
N° de catalogue Fo46-11/95-1990F
ISBN 0-662-96181-1
ISSN 0228-0736
Imprimé au Canada

Il est possible d'obtenir sans frais des exemplaires de cette publication auprès de :

Forêts Canada
Centre national de diffusion
Institut forestier national de Petawawa
Chalk River (Ontario)
K0J 1J0

Téléphone : 613-589-2880

Des copies ou des microfiches de cette publication sont en vente à l'adresse suivante :

Micromédia Ltée
Place du Portage
165, rue Hôtel-de-Ville
Hull (Québec)
J8X 3X2

This publication is also available in English under the title
Some protocols for cDNA library construction with conifer tissues.

Table des matières

v Résumé/Abstract

1 1. Introduction

1 2. Utilisation des techniques de clonage de l'ADNc
1 2.1 Embryogénèse et germination
2 2.2 Caractérisation des séquences régulatoires de gènes
3 2.3 Étude faisant appel au PLSR (polymorphisme à la longueur de séquences restreintes)
4 2.4 Régulation de l'expression génique par des hormones
5 2.5 Autres études

6 3. Extraction de l'ARN total des plantes
6 3.1 Réduction de l'activité de la ribonucléase
6 3.2 Extraction de l'ARN au phénol
7 3.3 Extraction au moyen de thiocyanate de guanidine
7 3.4 Extraction de l'ARN total
11 3.5 Autres méthodes d'extraction de l'ARN

14 4. Préparation et caractérisation de l'ARN poly $(A)^+$ (ARNm)
14 4.1 Caractérisation de l'ARNm
14 4.2 Séparation de l'ARNm de l'ARNr
15 4.3 Électrophorèse de l'ARNm sur gels d'agarose
16 4.4 Transfert de Northern
17 4.5 Fractionnement de l'ARNm selon la taille

17 5. Préparation et caractérisation de l'ADNc
17 5.1 Méthodes de préparation de l'ADNc
18 5.2 Facteurs influençant la synthèse du premier brin d'ADNc
19 5.3 Réaction de synthèse du premier brin d'ADNc
19 5.4 Synthèse du second brin d'ADNc
20 5.5 Calcul du pourcentage d'incorporation
21 5.6 Purification de l'ADNc
22 5.7 Fractionnement de l'ADNc en fonction de la taille

22 5.7.1 Chromatographie de l'ADNc sur Sepharose CL-4B
23 5.7.2 Utilisation de l'agarose à bas point de fusion
23 5.7.3 Séparation de l'ADNc sur gel de polyacrylamide
23 5.7.4 Séparation de l'ADNc sur gradients de sucrose

24 6. Clonage de l'ADNc
24 6.1 Clonage de l'ADNc au moyen du bactériophage lambda

24 6.1.1 Préparation d'ADNc à linker *Eco*RI
24 6.1.2 Ligation de l'ADNc aux bras du vecteur lambda ZAP ou du lambda gt10
25 6.1.3 Titrage des recombinants

27 6.2 Extraction de l'ADN phagique à petite échelle

27 6.2.1 Méthode de culture en milieu liquide
27 6.2.2 Méthode de lyse des plages

27 6.3 Amplification et conservation des banques
28 6.4 Caractérisation des inserts d'ADNc sur gels d'agarose
28 6.5 Préparation d'ADN plasmidique sur mini-prep
29 6.6 Remarques sur la croissance et la conservation d'*E. coli* et du phage lambda

29 7. Procédés d'hybridation par soustraction
29 7.1 Préparation de l'ADNc marqué
30 7.2 Création de banques d'ADNc obtenues par clonage directionnel et isolement de l'ADN phagique recombinant
32 7.3 Réaction de transcription
32 7.4 Réactions d'hybridation

33 Remerciements

33 Bibliographie

38 Annexe I. Solutions mères
44 Annexe II. Fournisseurs choisis de produits chimiques, de cellules et de vecteurs
53 Annexe III. Fournisseurs de matériel et d'équipement

Résumé

Dans ce manuel, nous décrivons divers procédés permettant de constituer des banques d'ADNc à partir de tissus de conifères ou d'autres plantes. Nous donnons des méthodes d'extraction de l'ARN se distinguant par la composition du tampon, la durée de l'extraction, la nécessité de l'ultracentrifugation, le degré de purification et divers autres aspects. Nous expliquons aussi comment séparer l'ARNm (messager) de l'ARNr (ribosomique), comment réaliser l'électrophorèse de l'ARNm et le transfert de Northern.

En ce qui a trait à la constitution d'une banque d'ADNc, nous décrivons des méthodes de synthèse du premier et du second brin, l'isolement de l'ADNc de masse moléculaire élevée, l'électrophorèse de l'ADNc, la ligature au vecteur, l'extraction de l'ADNc inséré dans le vecteur, etc.

Enfin, nous donnons des renseignements qui seront peut-être utiles à ceux qui commencent à travailler dans le domaine. Y sont inclus notamment une liste des adresses des fournisseurs de produits chimiques et d'équipement, des recettes de solutions-mères, des sources d'information plus détaillée et des conseils quant aux méthodes qui, d'après notre expérience, devraient donner les meilleurs résultats selon le type de tissu ou l'espèce.

Abstract

The Handbook presents various protocols for constructing cDNA libraries using conifer or other plant tissue as a source. Included are methods for RNA extraction that vary in terms of buffer composition, length of time for extraction, the requirement for ultracentrifugation, the degree of purification, and others. Methods for separating messenger (m) RNA from ribosomal (r)RNA, electrophoresis of mRNA, and Northern blotting are described.

For cDNA library construction, methods are presented for first and second strand synthesis, isolation of high molecular weight cDNA, electrophoresis of cDNA, ligation reactions to the vectors; extraction of insert cDNA from the vector, etc.

Also included is information that may be useful for those starting to work in this field, such as addresses for suppliers of chemicals and equipment, recipes for stock solutions, references for more detailed information, and suggestions from our experience as to which method might be successful for different tissues and species.

1. Introduction

Le présent Guide relate l'expérience que nous avons acquise dans le domaine de la création de banques d'ADNc (ADN complémentaire) à partir de l'ARNm de graines de conifères. Il est conçu pour venir en aide à ceux qui débutent dans le domaine ou à ceux qui sont déjà familiers avec ces techniques, mais qui voudraient essayer celles que nous avons utilisées avec succès. Plusieurs méthodes employées sont des modifications des méthodes tirées de périodiques, d'autres guides, notamment celui de Maniatis et collab. (1982), de volumes comme «Methods in Enzymology», de procédés provenant de fournisseurs comme Amersham et Promega, de publications de fournisseurs de produits chimiques comme «Focus» (BRL), de communications personnelles et d'autres sources.

Nos travaux ont porté sur des conifères, mais le Guide présente des méthodes que nous avons essayées et qui pourraient être utilisées pour d'autres tissus semblables. Étant donné que certains procédés, comme celui qui est employé à l'extraction de l'ARN, peuvent varier selon les espèces et même selon les tissus, nous avons présenté des méthodes de remplacement. Par exemple, Hutchison (1988) a montré que l'extraction de l'ARN des tissus d'aiguilles de conifères exige la présence de Triton X-100 dans le tampon d'extraction, à la place du sulfate de dodécyle. On utilise ce dernier détergent dans l'extraction de l'ARN de graines.

On choisit le vecteur pour le clonage en fonction de l'usage que l'on veut faire de la banque. Nous avons travaillé récemment avec le vecteur lambda ZAP de Stratagene. Étant donné que le gène Lac Z est présent, il est possible de choisir les recombinants en fonction des couleurs bleue et blanche. En outre, ce vecteur nous permet d'obtenir facilement des plasmides simple ou double brins renfermant des inserts d'ADNc. Ce vecteur facilite entre autres, la détermination de la séquence, la production de sondes d'ARN d'activité spécifique élevée, la traduction *in vitro*, le criblage à l'aide de sondes immunochimiques et nucléotidiques, le clonage directionnel, etc.

Nous relevons également dans la littérature les nombreux usages des techniques de clonage de l'ADNc et nous présentons des données de base sur l'extraction de l'ARN et les techniques de clonage. Nous présentons également une bibliographie complète. Une fois le clone d'ADNc isolé, il peut servir à isoler le gène complet à partir d'une banque génomique (voir DeVerno et collab., 1990).

2. Utilisation des techniques de clonage de l'ADNc

2.1 Embryogénèse et germination

Quelques études au niveau moléculaire s'occupaient de l'embryogénèse et de la germination chez les essences de conifères. Dans deux rapports récents traitant la germination des graines de pin gris (*Pinus banksiana* Lamb) et du mélèze (*Larix laricina* [Du Roi] K. Koch), nous avons montré que, dans le cas des embryons, l'activité de plusieurs enzymes est faible dans les semences sèches ou imbibées, mais qu'elle augmente de façon considérable avec l'émergence des radicelles et la croissance subséquente (Pitel et Cheliak; 1986, 1988a). Toutefois, chez les gamétophytes, l'activité des enzymes diminue au cours des derniers stades de la germination du pin gris. Nous avons créé des banques d'ADNc à plusieurs stades d'imbibition et de germination du pin gris pour faciliter l'étude des modifications de l'expression des gènes au cours de cette période de croissance et de différentiation.

Dans des études sur l'embryogénèse de la graine et le début de la germination chez le coton (*Gossypium hirsutum*), nous avons observé des changements dans la population de six groupes différents d'ARNm abondants dans les cotylédons, comme le montre la synthèse protéique *in vivo* et *in vitro* (Dure, 1985). Ainsi, un groupe d'ARNm codant pour l'actine, par exemple, est présent à tous les stades, un deuxième groupe provient de gènes qui ne s'expriment pas après la germination, un troisième groupe d'ARNm s'exprime à fond seulement au début de l'embryogénèse, un quatrième, représentant l'ARNm des protéines de stockage, s'exprime pendant la plus grande partie de l'embryogénèse, mais diminue alors rapidement à la fin de ce stade de développement; un cinquième groupe d'ARNm devient abondant à la fin de l'embryogénèse, puis diminue rapidement après quelques heures de germination; et le sixième groupe d'ARNm devient abondant à la fin de l'embryogénèse et reste abondant plusieurs jours après la germination. A l'aide des techniques d'hybridation des acides nucléiques, Galau et Dure (1981) ont également observé des changements dans les classes d'ARNm moins abondants lors de l'ontogénie des cotylédons de coton. À la fin de l'embryogénèse, environ 30 000 gènes ont participé à la production des séquences d'ARNm chez le soja et le coton, selon Dure (1985). Au milieu de l'embryogénèse, les ARNm des protéines de stockage sont abondants. Le nombre total de gènes codant des ARNm différents chez toute la plante, peut dépasser les 60 000. Dans des études ultérieures chez le coton (voir Chlan et collab., 1986), on a séquencé des clones d'ADNc représentant les groupes différents de protéines de stockage des semis de coton. En outre, à l'aide de banques d'ADNc, on a isolé et séquencé des clones d'ADNc représentant certains des ARNm produits par les gènes

abondants de la fin de l'embryogénèse (Baker et Dure, 1987). Dans une étude semblable chez des graines de radis, Laroche-Raynal et collab. (1984) ont étudié la fraction d'ARNm de graines sèches et immatures et de semis de 2 et de 4 heures. Utilisant des techniques de traduction *in vitro*, ils ont observé qu'un sous-groupe d'ARNm s'accumule à la fin de l'embryogénèse, demeure présent chez la graine sèche (avec quelques autres types d'ARNm), puis disparaît au début de la germination. Dans d'autres études, on a également étudié des modifications de l'expression des gènes coïncidant avec l'embryogénèse, la germination et le rôle des ARNm stockés dans les graines sèches, souvent en utilisant la technologie de l'ADN recombinant (voir Suzuki et Minamikawa, 1985; Koshiba et collab., 1986; Reeves et collab., 1986; Kreis et collab., 1986; Walling et collab., 1986; Bartels et Thompson, 1986; Tercé-Laforgue et collab., 1987; Domoney et Casey, 1987; Dietrich et collab., 1987; Datta et collab., 1987; Dietrich et collab., 1989; Goldberg et collab., 1989; Harada et collab., 1989). Toutefois, on ne fait que commencer à utiliser ce genre d'analyses chez les conifères (voir Pitel et Cheliak, 1988b). On utilise également des techniques semblables pour étudier la régulation des gènes associée à l'embryogénèse somatique (voir Choi et collab., 1987; Hahne et collab., 1988).

L'hybridation différentielle est une méthode qui permet de repérer les clones d'ADNc des ARNm régulés par le développement. On prépare ainsi l'ADNc marqué au ^{32}P à partir de l'ARNm provenant des deux stades d'intérêt. Même si la plupart des séquences d'ADNc sont les mêmes dans les deux préparations, l'ADNc synthétisé à partir de l'ARN du tissu à un stade plus avancé de différentiation (ou traité par des hormones, etc.) comporte d'autres séquences complémentaires aux nouvelles séquences d'ARNm. Les deux sondes prélèvent donc des filtres répliques de la banque d'ADNc préparée à partir de l'ARNm extrait de la population de cellules induites. Un signal d'hybridation se produisant spécifiquement pour la sonde d'ADNc des cellules induites devrait renfermer l'ADNc des ARNm induits. Toutefois, cette méthode ne fonctionne que lorsqu'un gène s'exprime par une production très abondante d'ARN dans un type de cellules et elle est rare ou absente dans un autre. La limite de détection correspond à la quantité d'ARNm représentant 0,1 % de la population totale d'ARNm. Toutefois, la plupart des gènes ne sont représentés que par environ 20 copies d'ARNm par cellule (classe de gènes peu abondants), de sorte qu'on ne peut pas utiliser une approche simple de criblage de copies. Une cellule eucaryote ne renferme habituellement que 1 pg d'ARNm (soit environ 10^6 molécules) transcrit à partir de quelque 15 000 gènes différents.

Palazzolo et Meyerowitz (1987) ont décrit la construction du vecteur phagique de clonage d'ADNc lambda SWAJ qui permet le clonage directionnel d'ADNc et l'amplification sélective des séquences d'ARNc sens ou à contresens. De tels vecteurs comportent les promoteurs SP6 et T7 ainsi que plusieurs sites de restriction uniques. On peut se procurer ces vecteurs chez Promega Biotec sous les noms «Lambda GEM-2 et Lambda GEM-4». Ces vecteurs ont été préparés principalement pour remédier au fait que l'hybridation par soustraction (utilisée pour repérer les gènes rares associés à certains stades de développement ou à certains tissus) exige jusqu'à 20 µg d'ARN poly $(A)^+$ pour une hybridation (Davis et collab., 1984). Toutefois, le système susmentionné permet de fabriquer 20 µg d'ARNc sens à partir d'une banque d'ADNc d'un tissu et de synthétiser de l'ADNc marqué au ^{32}P à partir de l'ARNm provenant de l'autre tissu renfermant les ARNm d'intérêt. On ne prépare que 1 µg d'ARNm de chaque tissu. Après hybridation et soustraction, la sonde d'ADNc différentielle permet de cribler une banque génomique ou d'ADNc appropriée. Cette méthode permet également de repérer les séquences présentes dans une banque et absentes dans une autre, de préparer des sondes pour une hybridation *in situ*, de créer des banques d'ADNc par soustraction à l'aide de ces vecteurs dans le but de produire des sondes d'ARNc contresens monocaténaires d'activité spécifique élevée directement à partir d'ADN issu de toute la banque obtenue par soustraction ou de clones individuels. La méthode de clonage directionnel d'ADNc fait appel à un oligodésoxynucléotide servant d'amorce et d'adapteur renfermant le site de reconnaissance de l'enzyme *Xba*I en amont d'une séquence d'oligo (dT). Cette méthode permet de synthétiser un ADNc présentant une séquence de reconnaissance *Xba*I à l'extrémité 3′ de chaque molécule. Après la synthèse du deuxième brin, des linkers *Eco*RI sont ajoutés à chaque extrémité. Une double digestion avec les enzymes de restriction *Eco*RI et *Xba*I permet d'obtenir de l'ADNc bicaténaire présentant des extrémités cohésives différentes. On peut alors cloner de façon directionnelle l'ADNc dans le vecteur qui présente les deux mêmes extrémités cohésives. Cette méthode permet de repérer des ARN représentant seulement 0,01 % de la population totale d'ARNm (voir Sargent, 1987). On peut se procurer une autre méthode permettant d'obtenir des banques d'ADNc par soustraction de l'Invitrogen; nous en parlerons brièvement à la section 7.

2.2 Caractérisation des séquences régulatoires de gènes

Après avoir identifié et séquencé un clone d'ADNc, on peut le marquer (par exemple en utilisant des hexamères de séquence aléatoire comme ceux qui sont décrits par Feinberg et Vogelstein (1983), ou en se procurant des kits disponibles dans le commerce à l'Amersham Inc. ou ailleurs) et l'utiliser comme sonde pour rechercher une séquence génomique correspondante dans la banque génomique homologue. Par conséquent, en comparant les deux séquences, on peut déterminer la position des introns, s'il y en a, et repérer les régions flanquantes 5′ et 3′. Certaines de ces sé-

quences peuvent servir de signaux spécifiques pour réguler l'expression des gènes.

L'un des éléments promoteurs est la «boîte TATA» qui, avec des protéines régulatoires spécifiques, peut jouer un rôle dans la transcription en alignant l'ARN polymérase II. Certains gènes, comme le gène nucléaire de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) codant pour une protéine liant la chlorophylle a ou b du photosystème I (Cab-6B), comportent deux boîtes TATA (Pichersky et collab., 1987). Ces deux boîtes sont situées au niveau des nucléotides -97 à -94 et -117 à -114, en amont du codon ATG de départ. On trouve deux régions CCAAT au niveau des nucléotides - 145 à -141 et -176 à -172 et une troisième 15 à 20 nucléotides plus loin que la boîte TATA la plus en aval. Nous ne savons pas encore laquelle de ces séquences joue un rôle dans l'activité de transcription du gène. De nombreux gènes partagent ces séquences consensus situées toujours aux mêmes endroits par rapport au site du début de la transcription. Les activateurs sont d'autres éléments régulateurs de la transcription (voir Grandbastien et collab., 1986; Boronat et collab., 1986). Contrairement aux promoteurs, la position et l'orientation des activateurs peuvent être différentes par rapport au site correspondant au début de la transcription. Ils peuvent grandement favoriser la transcription d'un gène lié à partir d'une position située en amont ou en aval d'une unité de transcription (par exemple les introns) de façon indépendante de l'orientation (Rosenthal, 1987). En outre, les activateurs ne comportent pas une homologie de séquence très poussée, contrairement aux éléments promoteurs. Certains activateurs peuvent être actifs dans une large gamme de cellules différenciées ou non différenciée, alors que d'autres sont spécifiques à un tissu. Les activateurs peuvent donc régler l'expression d'un gène dans un tissu en particulier (avec les protéines qui participent à l'action des activateurs dans un tissu en particulier) et assurent également la régulation de la quantité de protéines synthétisée dans une cellule en particulier. En revanche, des activateurs négatifs peuvent être présents et inhiber la transcription, indépendamment de la position et de l'orientation.

Les gènes rapporteurs peuvent permettre de déterminer le rôle joué par les divers éléments régulateurs. La séquence considérée comme une séquence régulatrice est liée à un gène rapporteur dont la transcription est décelée après la transfection dans des cellules eucaryotes en culture. Certains de ces gènes rapporteurs peuvent être des gènes bactériens codant pour des enzymes que l'on peut doser, comme la CAT (chloramphénicol acétyltransférase) ou la bêta-galactosidase (voir Rosenthal, 1987). Toutefois le système de dosage GUS (bêta-glucuronidase) devient de plus en plus populaire (Jefferson, 1987). La régulation de l'expression des gènes est également fonction de caractéristiques structurales de la chromatine, comme la présence de protéines n'appartenant pas à la famille des histones et comme les régions d'ADN-Z qui pourraient avoir un rôle à jouer dans la production et le maintien de régions de chromatine dite «déroulée», ou de sites hypersensibles à la DNase I.

2.3 Études faisant appel au PLSR (polymorphisme à la longueur de séquences restreintes)

A partir de nos banques d'ADNc de pin gris et d'épinette noire, nous utilisons des clones d'ADNc radioactifs pris au hasard (comptant chacun plus de 450 pb) que nous hybridons, dans les expériences de Southern blot, à l'ADN génomique de sept épinettes noires parentales en vue de déceler le PLSR. Dans les études antérieures, ces variations de la taille des fragments de restriction homologues envers une sonde spécifique ont été attribuées à des mutations ponctuelles de l'ADN susceptibles de créer ou d'éliminer des sites d'endonucléase de restriction ou à des zones d'insertion/délétion pouvant modifier la position relative des bandes. Selon Botstein et collab. (1980). Le nombre de PLSR est essentiellement limité, ils n'ont pas d'effet sur le phénotype, ils sont codominants, se transmettent selon un mode mendelien et l'environnement a peu ou point d'influence sur eux. Les sondes d'acides nucléiques trouvent une application importante dans l'élaboration de cartes physiques et génétiques.

Ces cartes, de même que les sondes spécifiques, ont déjà été proposées ou utilisées pour sélectionner des caractères (dépendant d'un seul ou même de plusieurs gènes) en faisant appel à des liens avec des marqueurs phénotypiques, pour protéger des variétés, évaluer les niveaux de contamination et obtenir une description plus précise des familles et des clones au moyen des empreintes digitales génétiques et pour obtenir des estimations plus précises du niveau de variation génétique des populations naturelles et domestiquées.

Dans une étude chez la laitue (*Lactuca sativa*), Landry et collab. (1987a) ont observé que les clones d'ADNc ont permis de déceler plus de polymorphisme que les sondes d'ADN génomique (environ 2,5 fois plus) et que les enzymes de restriction *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV et *Hin*dIII étaient les plus efficaces pour déceler le PLSR. Toutefois, dans les études humaines, les clones génomiques permettaient de déceler plus de polymorphisme que les clones d'ADNc (Helentjaris et Gesteland, 1983). Étant donné que les sondes génomiques comprennent des séquences transcrites et non transcrites, on s'attendrait à ce qu'elles permettent de déceler plus de variations que les clones d'ADNc, car les régions d'ADN transcrites sont davantage conservées que les régions non codantes. Utilisant des clones d'ADNc de séquence aléatoire dans des études chez la tomate, Bernatzky et Tanksley (1986a) ont indiqué que la majorité des gènes structuraux sont probablement situés à des loci uniques et qu'il n'en existe que peu de copies. Toutefois, comme ils l'ont indiqué dans un autre rapport (Bernatzky et Tanksley, 1986b), il pourrait être nécessaire d'utiliser

des sondes d'ADN génomique pour compléter la création d'une carte de linkage si certaines régions du génome ne sont pas détectées par les sondes d'ADNc.

Chez les plantes, on utilise le PLSR pour créer des cartes de linkage génétiques détaillées chez des espèces comme le maïs (*Zea mays*) (Helentjaris et collab., 1986; Evola et collab., 1986), la tomate (Bernatzky et Tanksley, 1986b) et la laitue (Landry et collab., 1987b). Le PLSR utilisées comme marqueurs génétiques servent à divers usages comme l'identification des souches (voir Evola et collab., 1987b), l'évaluation de l'hétérogénéité, les études sur l'évoluation, le clonage de gènes résistant aux maladies (Landry et collab., 1987b), le marquage des gènes contrôlant des caractères quantitatifs comme la quantité de matières solides solubles chez la tomate (Osborn et collab., 1987; Tanksley et Hewitt, 1988), l'identification et la cartographie des séquences d'ADN dupliqué dans le génome du maïs (Helentjaris et collab., 1988), etc. (voir par exemple Bernatzky et Tanksley, 1986b; Landry et Michelmore, 1987). A plus long terme, une étude de cartographie génomique pourrait nous permettre de créer un service de consultation génétique utile dans les programmes d'amélioration des arbres. Toutefois, il s'agit d'une tâche formidable qui pourrait exiger toute une génération d'arbres pour fournir une carte réellement utile. Une carte ainsi obtenue serait constamment en évolution par suite de l'identification de nouveaux caractères dans des généalogies sélectionnés.

2.4 Régulation de l'expression génique par des hormones

Les progrès récents dans la méthodologie de l'ADN recombinant nous permettent d'étudier certains gènes contrôlés par des hormones, ainsi que les protéines produites. Des expériences ont montré que l'auxine a une rôle à jouer dans l'expression de plusieurs gènes dans des tissus associés à la division cellulaire, à l'élongation cellulaire et, peut-être, à la différentiation cellulaire (voir Key, 1987). Dans une étude chez les hypocotyles matures de soja (*Glycine max*), on a observé que l'auxine augmente la synthèse de l'ARNr, l'activité de la polymérase I et l'accumulation de protéines ribosomiques. Ce traitement provoque l'induction de la division cellulaire dans les régions matures. Étant donné que l'auxine augmente d'un facteur de huit la quantité d'ARNm traduisible pour les protéines ribosomiques, Gantt et Key (1985) ont créé une banque d'ADNc pour repérer les clones d'ARNm de protéines ribosomiques. Une analyse des gels par transfert de Northern a montré que l'utilisation d'une sonde d'ADNc codant pour la protéine ribosomique L13 dans le cytoplasme provoque une augmentation de la concentration d'ARNm de protéines ribosomales de trois à huit fois après 18 h (Key, 1987). L'auxine contrôle également la concentration de certains ARNm. Baulcombe et Key (1980) ont cloné une banque d'ADNc faite à partir d'ARN polyadénylé témoin et ont criblé les colonies à l'aide d'ADNc marqué complémentaire de l'ARNm polyadénylé des tissus témoins et des tissus traités à l'auxine. Ils ont isolé des clones d'ADNc de trois ARN polyadénylés différents qui répondaient rapidement à l'action de l'auxine et qui étaient abondants dans le tissu témoin (2,1 % de la quantité totale). La concentration de chacune de ces séquences diminuait rapidement après 24 h de traitement à l'auxine, mais la diminution avait surtout lieu avant le début de la division cellulaire provoquée par l'auxine.

On a relevé plusieurs ARNm contrôlés par l'auxine dans les études sur l'élongation cellulaire. Ainsi, dans les études *in vitro* sur la traduction de l'ARN polyadénylé et les gels en 2 dimensions, on a montré que l'auxine augmente sélectivement la concentration d'ARNm traduisible des hypocotyles de soja excisés (Zurfluh et Guilfolyle, 1982). Après un traitement à l'auxine des hypocotyles excisés en élongation, Walker et Key (1982) ont isolé de l'ARN polyadénylé et ont créé des banques d'ADNc. Cette expérience a permis d'isoler deux clones d'ADNc associés à l'élongation cellulaire. En l'absence d'auxine, les séquence d'ARN de ces clones s'épuisaient rapidement lors de l'incubation des sections de tissus excisés. L'addition de l'auxine à ces préparations de tissus a provoqué une accumulation rapide des deux types d'ARN polyadénylé. L'ARN d'un clone (JCW2) a augmenté de cinq à dix fois en 30 à 60 min. Les auteurs ont indiqué que l'augmentation de l'élongation cellulaire par l'auxine provenait d'une augmentation de la synthèse d'ARNm spécifiques «limitants» et de leurs produits de traduction. On a isolé des clones génomiques homologues de certains des clones susmentionnés et on a initié la détermination de séquence pour étudier le mécanisme par lequel l'auxine contrôle l'expression de ces gènes et la fonction des protéines correspondantes (Key, 1987). Des vecteurs d'expression peuvent servir à fabriquer des anticorps utiles dans les études de localisation cellulaire et d'autres études.

Hagen et collab. (1984) ont isolé quatre clones d'ADNc différents d'ARN polyadénylés dont la concentration augmente dans les hypocotyles de soja en réponse à l'auxine. Ces clones ont été criblés dans une banque d'ADNc fabriquée à partir d'ARN polyadénylé de semis traités au 2,4-D. Les modifications provoquées par l'auxine sont rapides; des études de transcription *in vitro* rapides de noyaux isolés de tissus témoins et de tissus traités à l'auxine ont montré qu'elles sont dues à une augmentation de la vitesse de transcription (Hagen et Guilfoyle, 1985; Guilfoyle et Hagen, 1987). Après avoir ajouté de l'auxine à des plumules excisées, on observe au bout de 15 min un taux de transcription au moins égal à la moitié du taux maximum pour un clone (pGH1-4), alors que pour un autre clone (pGH3), on observe une augmentation de plusieurs fois le taux de transcription moins de 5 min après l'application de l'auxine. Diverses auxines (IAA, NAA et 2,4,5-T) et d'autres substances chimiques comme le $CdCl_2$, augmentent le taux de transcription des gènes de deux des ARNm sensibles à l'auxine. Toutefois, l'éthylène (dont la synthèse

peut être stimulée par l'application d'auxines) ne provoque pas la réaction typique en réponse à un traitement par l'auxine. Étant donné que la transcription est induite rapidement, il peut s'agir de phénomènes de transcription sélective (une petite quantité de clones d'ADNc sont impliqués) et directe (indépendante de la synthèse des protéines) se produisant à proximité du principal site d'action de l'auxine (Hagen, 1987).

2.5 Autres études

Il existe une bibliographie abondante sur les techniques touchant l'ADNc; nous ne pouvons signaler au lecteur que des échantillons représentatifs des travaux publiés sur le sujet.

Hiesel et Brennicke (1987) ont été les premiers à créer une banque d'ADNc pour obtenir de l'information sur des gènes activement transcrits avant de caractériser l'ADN mitochondrial des plantes, dont les gènes sont souvent séparés par des régions non codantes importantes. Ils ont observé la présence d'ADNc de tous les gènes connus.

Dans des études sur la tolérance du maïs aux herbicides, Wiegard et collab. (1986) ont isolé des clones d'ADNc de la principale sous-unité polypeptidique des glutathion-S-transférases (GST), appelée GST A. Chez le maïs, ces enzymes conjuguent le glutathion à plusieurs catégories importantes d'herbicides sélectifs utilisés en pré-émergence. Entre autres études, les auteurs ont utilisé ce clone comme sonde dans des analyses de Northern ayant pour but d'étudier les concentrations d'ARNm après un traitement aux phytoprotecteurs.

On pense que le mûrissement du fruit, qui s'accompagne de modifications de la couleur, de la texture et de l'arome, provient de l'altération de l'expression de gènes spécifiques qui règlent à leur tour l'activité de certains enzymes. On a utilisé des banques d'ADNc pour repérer et caractériser des clones d'ADNc spécifiques au mûrissement (voir Morgens et collab., 1987; Piechulla et Gruissen, 1987; Della Penna et collab., 1987; Maunders et collab., 1987). Par exemple, Della Penna et collab. (1987) ont observé une augmentation de la concentration d'ARNm de la polygalacturonase d'un facteur de 2000 au cours du mûrissement après utilisation des clones d'ADNc codant pour l'enzyme. Même si l'on étudie encore les agents responsables de la régulation de certains gènes au cours du développement et du mûrissement du fruit (par exemple hormones, séquence d'ADN, protéines de liaison, environnement), on sait que l'expression des gènes codant pour la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rbcS) et la protéine liant la chlorophylle a/b lors de la croissance en présence de lumière sont stimulées par la lumière. Dans un rapport de synthèse, Kuhlemeier et collab. (1987) ont décrit divers résultats associés aux éléments cis et trans qui participent à la transcription des gènes réglés par la lumière. Au cours des processus de développement et de mûrissement du fruit, il existe des mécanismes régulatoires pour les gènes nucléaires et plastidiques (par exemple, le protéine liante Q_b, psbA) et ces mécanismes agissent en étroite coordination à ce moment-là. Utilisant des techniques de clonage de l'ADNc, Titlgen et collab. (1986) ont isolé de nombreux gènes nucléaires du complément des polypeptides de la membrane thylakoïde de l'épinard.

Le clonage de l'ADNc est utile pour étudier l'induction de l'expression de gènes à la suite de divers types de stress environnemental. Par exemple, dans leur exposé de synthèse, Sachs et Ho (1986) ont caractérisé des clones anaérobies spécifiques d'ADNc du maïs. Ils s'en sont servis, entre autres, comme sondes pour mesurer l'expression de gènes en anaérobiose. La cinétique de l'augmentation des ARNm était la même pour Adh1 et Adh2; dans les deux cas, la concentration a commencé à augmenter après 90 min d'anaérobiose et a continué d'augmenter jusqu'à atteindre, après 5h, un plateau correspondant à 50 fois la concentration en aérobiose. Dans le cas de Adh1, la concentration a diminué après 49 h et dans le cas de Adh2, elle a diminué après 10 h. En caractérisant plus à fond les séquences d'ADN associées aux régions codantes et à la régulation de l'expression des protéines du stress, il pourrait être possible d'introduire les gènes codant pour les protéines du stress des plants tolérants dans des plants sensibles pour que ceux-ci supportent les conditions de stress.

Il faut faire appel à la biologie moléculaire pour étudier l'expression des gènes des plantes en réponse à des agents pathogènes ou déclenchants. Par exemple, on a caractérisé les gènes de certaines protéines reliées à des maladies (protéines induites par des virus, des bactéries et des champignons ainsi que par des agents déclenchants abiotiques, comme la lumière uv et certains produits chimiques, et codées par l'hôte) au moyen de banques d'ADNc (voir Collinge et Slusarenko, 1987). Matsuoka et collab. (1987) ont étudié les séquences de plusieurs clones d'ADNc associés à des maladies. La recherche d'ADNc conférant une résistance a pour but, entre autres, de sonder les banques génomiques de l'ADN de l'hôte pour élucider les séquences régulatoires en amont contrôlant l'expression des gènes. On a également fait appel des techniques de clonage d'ADNc dans des expériences avec d'autres types de réponses à des agents pathogènes ou déclenchants, comme le niveau du métabolisme des phénylpropanoïdes ou l'augmentation de l'activité de l'endochitinase. Des études plus poussées dans ce domaine pourraient faire appel à des plants transgéniques renfermant des gènes clonés associés à la défense ainsi qu'à des dosages par ralentissement sur gel, de cartographie hypersensible à la DNase et aux techniques de cartographie de l'ADN pour étudier la nature des séquences régulatoires pertinentes et les élements de régulation agissant en trans. (Collinge et Slusarenko, 1987).

Pena-Cotes et collab. (1988) ont isolé chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) des clones d'ADNc

et d'ADN génomique codant pour l'inhibiteur II de la protéinase, un inhibiteur de la trypsine et de la chymotripsine. Ces clones ont servi à suivre l'induction de l'expression des gènes de l'inhibiteur II de la protéinase au niveau de l'ARN suite à une blessure.

De nombreuses études traitant les techniques d'ADNc ont été présentées lors d'une récente réunion, et des résumés ont également été publiés dans le Journal of Cellular Biochemistry (UCLA Symposia on Molecular Biology, Journal of Cellular Biochemistry, Supplément 12C, 1988, Alan R. Liss, Inc., New York). Parmi ces études, on relevait une analyse de l'expression des gènes reliés au développement de la fleur; l'induction de gènes chez des semis de céréales soumis à un stress par l'acide abscisique; le repérage et la caractérisation de séquences spécifiques à un tissu; l'activation de gènes dans les tissus du fruit par l'éthylène; la caractérisation de clones d'ADNc spécifiques au pollen; le repérage de clones d'ADNc de *Larix laricina* pour la petite sous-unité de la ribulose bisphosphate carboxylase/oxygénase (rbcS) et pour la protéine complexe (liant la chlorophylle a/b) associée à la croissance à la lumière; l'expression des gènes responsables de l'activité de la cellulase associée au mûrissement du fruit; l'analyse des gènes induits par le choc thermique; la caractérisation de la régulation de l'activité des enzymes; l'identification des séquences reliées à l'hémoglobine chez les espèces ne formant pas de nodules et l'analyse de l'expression génique associée à la formation du méristème.

3. Extraction de l'ARN total des plantes

3.1 Réduction de l'activité de la ribonucléase

Les cellules et tissus renferment habituellement des ribonucléases très stables. Un traitement inadéquat peut contaminer la verrerie, l'équipement et les solutions. La verrerie utilisée pour les études de l'ARN doit donc être neuve et réservée à ce seul usage. Après avoir nettoyé la verrerie au moyen d'un détergent, il faut la laisser tremper dans une solutions de pyrocarbonate de diéthyle à 0,1 % (DEPC, un inhibiteur non spécifique de la RNase), puis la passer à l'autoclave pour éliminer les traces de DPEC et la mettre dans une étuve à 250°C pendant au moins 3 h. Il faut utiliser des articles steriles, jetables, faits du plastique. Par exemple, nous utilisons dans la mesure du possible du matériel stérile emballé individuellement : pipettes, embouts de pipette, etc. Nous utilisons également des tubes coniques stérilisé à bouchon à vis en polypropylène de 15 mL et de 50 mL (par exemple Sarsted), notamment pour l'extraction de mélanges d'ARN au phénol. Les tubes et embouts de pipettes Eppendorf et les autres articles non stériles en plastique doivent être passés à l'autoclave avant usage. On recommande de toujours porter des gants jetables en plastique ou en latex.

On traite d'abord les solutions au DEPC, puis on élimine le DEPC, car il réagit avec les résidus adénines de l'ARN et inactive les réaction de traduction *in vitro*. On ajuste la concentration de DPEC à 0,1 %. on l'agite ou on brasse énergiquement pendant 10 min, puis on la passe à l'autoclave. Les produits de décomposition, le CO_2 et l'éthanol, sont volatils et s'échappent donc facilement des solutions chaudes. Étant donné que le DEPC réagit avec le Tris, il faut préparer ces tampons avec de l'eau passée à l'autoclave et traitée au DEPC et repassée à l'autoclave. Dans la mesure du possible, il faut acheter des produits secs, et les réserver uniquement pour les travaux sur l'ARN et les peser au moyen de spatules passées à l'étuve.

Étant donné que certains tissus ou cellules ont de fortes concentrations de ribonucléases endogènes, on peut ajouter divers inhibiteurs spécifiques et non spécifiques de la ribonucléase au cours de l'isolement de l'ARN, de la préparation de l'ADNc ou d'autres réactions auxquelles l'ARNm participe. Par exemple, la RNAsine (inhibiteur placentaire de la ribonucléase) est un puissant inhibiteur de la RNase utile dans les études *in vitro* comme la transcription nucléaire, la traduction dans des sytèmes acellulaires et la transcription inverse de l'ARNm. Pour que cet inhibiteur soit actif, il faut ajouter au moins 1 mM de dithiothréitol. Ainsi, on peut facilement l'éliminer par extraction au phénol. Maniatis et collab. (1982) ont décrit la préparation d'une autre inhibiteur spécifique, les complexes vanadyl-ribonucléosides. On peut utiliser des inhibiteurs non spécifiques, comme le sulfate de polyvinyle, l'héparine et une solution à 2 % d'argiles (bentonite ou macaloïde), mais ils ne sont pas complètement satisfaisants (Blumberg, 1987). La pronase ou la protéinase K (surtout lorsqu'on ajoute des agents dénaturants comme le SDS à 1-2 %) est utile pour digérer la ribonucléase et d'autres protéines. On peut isoler de l'ARN intact de tissus riches en RNase en présence d'agents chaotropiques comme le thiocyanate de guanidine et d'agents réducteurs comme le β-mercaptoéthanol.

3.2 Extraction de l'ARN au phénol

Il faut redistiller le phénol s'il est sous forme de cristaux ou s'il présente une coloration jaune ou rose. Ces produits colorés (par exemple quinones, diacides) peuvent couper les liens phosphodiesters et les liaisons entre les brins d'ADN. Étant donné que l'oxydation du phénol augmente avec le pH (par exemple, lorsqu'on l'équilibre au moyen de tampons dont le pH est supérieur à 8), il faut préparer ces réactifs au dernier moment et ne pas les stocker. Pour retarder l'oxydation, il est bon d'ajouter au phénol un antioxydant comme la 8-hydroxyquinoline (0,1 %, p/v), qui, en outre, inhibe partiellement la ribonucléase et dont la couleur jaune permet de mieux distinguer les phases. Dans certains cas, on équilibre le

phénol avec du tampon TE (3 mL de TE par 10 mL de phénol) et on le conserve ainsi à l'abri de la lumière à 4°C pendant un mois tout au plus. Dans les études sur l'ARN, le phénol est habituellement équilibré avec un tampon Tris-HCl (voir Annexe I).

L'addition de chloroforme, c'est à dire l'extraction au moyen du mélange de phénol (saturé de TE)-chloroforme-alcool isoamylique (24:24:1, v/v/v) améliore l'efficacité d'extraction de l'ARN (et de l'ADN). Le chloroforme facilite la rupture des liens entre les acides nucléiques ainsi que les protéines et contribue à éliminer les lipides, et sa haute densité permet une meilleure séparation des phases.

Il faut bien vérifier le pH du tampon d'extraction, car il est facile de perdre l'ARN. En utilisant uniquement du phénol pour extraire l'ARN à un pH inférieur à 7,6, on perd de l'ARNm poly $(A)^+$ dans la phase organique et certains fragments de poly $(A)^+$ peuvent également être coupés. Pour s'assurer de récupérer l'ARN poly $(A)^+$ dans la phase aqueuse, il faut faire l'extraction à pH 9, ou entre pH 5 et 9 en présence de chloroforme ou de SDS. A un pH supérieur à 8, l'ADN et l'ARN se retrouvent dans la phase aqueuse, alors qu'à pH 5-6, l'ADN est sélectivement retenu dans la phase organique et à l'interphase.

L'extraction des ARNm en présence de fortes concentrations de sel (NaCl 0,2-0,5 M) peut réduire l'action de la ribonucléase, mais la récupération optimale des RNA s'obtient à des concentrations de sel inférieures à 0,2 M. La solubilité maximale des RNA est atteinte à 0,15 M de Na^+, une concentration permettant également de réduire l'agrégation non spécifique des ARN. Les faibles concentrations de NaCl ne peuvent être utilisées que s'il n'y a pas de ribonucléase endogène ou si des inhibiteurs efficaces de la ribonucléase sont présents dans le milieu d'extraction (Wallace, 1987).

Le détergent ionique SDS dissocie les protéines des acides nucléiques et inhibe légèrement les nucléases. Une brève exposition de l'extrait à de fortes concentrations de SDS (0,1-2,0 %) à 10°C ou plus libère efficacement l'ARN. La présence d'EDTA empêche l'agrégation des acides nucléiques entre eux et aux protéines, ce qui se produit lorsque des ions Mg^{2+} sont présents dans le milieu d'extraction. Pour dissocier davantage les protéines et réduire la quantité de protéines à l'interphase, on peut incuber l'extrait avec de la protéinase K (50-200 µg/mL, concentration finale) à 37°C pendant 30 min en présence de SDS. L'addition de puissants inhibiteurs de la ribonucléase, comme les complexes vanadyl-ribonucléosides et la RNAsine, aux extraits d'ARN avant l'extraction au phénol est parfois requise pour extraire des ARNm intacts de tissus renfermant de fortes concentrations de ribonucléase (Wallace, 1987). Même si l'extraction des ARNm doit être faite aussi rapidement que possible à 0-4°C et avec des tampons froids pour réduire l'activité de la nucléase au minimum, l'addition de SDS exige d'effectuer l'extraction à une température d'au moins 10°C. Lorsque l'extrait ne renferme que de faibles concentrations de ribonucléase endogène, l'extraction au phénol peut être faite à 50-60°C.

3.3 Extraction au moyen de thiocyanate de guanidine

Le thiocyanate de guanidine et l'isothiocyanate de guanidine (les sels de guanidine de l'acide thiocyanique) ne sont en fait qu'un seul et même composé en solution. À une concentration de 4 M, il s'agit d'un puissant agent dénaturant des protéines, très efficace pour inhiber la RNAse lors de l'isolement d'ARN de tissus riches en RNAse. Ce composé est dangereux lorsqu'il est absorbé par les voies respiratoires ou digestives, et on ne doit l'utiliser qu'à un endroit bien ventilé.

Une des étapes critiques de l'extraction est l'élimination de l'homogénat et le lavage de la surface du culot d'ARN après l'ultracentrifiguation. Il faut se rappeler que même si les RNAses sont dénaturées dans le thiocyanate, elles peuvent se renaturer lorsque ce dernier est dilué et recouvrer ainsi leur activité. Une méthode consiste à couper la partie supérieure du tube à centrifuger et de laver la surface du culot trois fois avec de l'eau désionisée stérile. Le culot doit avoir l'aspect d'une lentille transparente.

On peut augmenter l'efficacité de la dénaturation au thiocyanate de guanidine en ajoutant un agent réducteur, comme le 2-mercaptoéthanol ou le dithiothréitol pour briser les liens disulfures entre les molécules de protéines. Dans certains rapports, on indique de ne pas utiliser le DEPC étant donné sa réactivité avec les acides nucléiques. Les tissus congelés doivent être pulvérisés dans l'azote liquide, puis homogénéisés (au moyen d'un Polytron ou d'un mélangeur Waring) immédiatement pour ne pas laisser le temps à la préparation de dégeler après l'addition des solutions de guanidine. Dans le cas de certains tissus, l'utilisation d'un piston motorisé donnait des ARN fortement dégradés. Il existe une méthode pour séparer l'ARN des autres macromolécules par précipitation sélective à l'éthanol ou au chlorure de lithium, mais elle ne donne pas de bons résultats lorsque la concentration d'ARN est faible dans l'homogénat; dans ce cas, l'ARN peut ne pas précipiter. Pour obtenir une bonne récupération de l'ARN, il faut le centrifuger dans une solution dense de chlorure de césium. Le culot d'ARN peut nécessiter une purification supplémentaire par extraction au phénol. Une digestion à la protéinase K est utile lorsque des peptides sont liés à l'ARN par des liens covalents. En utilisant un Polytron pour homogénéiser la préparation, on brise l'ADN nucléaire et on empêche ainsi l'ADN de former une couche impénétrable qui pourrait entraver la sédimentation de l'ARN.

3.4 Extraction de l'ARN total

Les méthodes d'extraction de l'ARN peuvent varier d'une espèce à l'autre ou d'un tissu à l'autre. Nous décrirons plusieurs méthodes que nous avons utilisées avec

succès pour extraire l'ARN de graines de conifères. Même si les cinq méthodes d'extraction proposées se sont révélées fructueuses dans le cas des graines, nous avons le plus souvent utilisé la première méthode. Au cours de l'extraction des ARNm, il est important de réduire au minimum l'activité de la ribonucléase dans les premiers stades et d'éviter l'introduction accidentelle de traces de ribonucléase par le biais de la verrerie et des solutions. Les articles stériles jetables en plastique sont essentiellement exempts de RNAse et peuvent être utilisés sans prétraitement. Toutefois, la verrerie doit être traitée dans une étuve à 250°C pendant 3 h ou plus ou à 180°C pendant au moins 8 h. On peut également la traiter pendant 12 h à 37°C dans une solution de diéthylpyrocarbonate à 0,1 %. Ce composé est un puissant inhibiteur de la RNAse, mais il ne l'inhibe pas complètement. Il faut alors éliminer les traces de diéthylpyrocarbonate en chauffant à 100°C pendant 15 minutes.

Il ne faut pas oublier de porter des gants à toutes les étapes de la préparation des substances et des solutions et au cours de toutes les manipulations de l'ARN. Toutes les solutions doivent être préparées à l'aide de verrerie passée à l'étuve, d'eau distillée sous verre et passée à l'autoclave et de produits chimiques secs manipulés avec des spatules passées à l'étuve. Il faut dans la mesure du possible traiter les solutions au DEPC à 0,1 % pendant au moins 12 heures et les passer à l'autoclave pendant 15 minutes. Toutefois, le diéthylpyrocarbonate ne peut pas être utilisé pour traiter les solutions renfermant du Tris. Il faut détruire toute trace de diéthylpyrocarbonate car il modifie l'ARN. En outre, il s'agit d'un agent alkylant puissant qui doit être utilisé avec précaution.

Méthode d'extraction no. 1

La méthode suivante est essentiellement celle décrite par Kreibel (communication personnelle) et Whitmore et Kreibel (1987):

1. Broyer 10 g de tissue dans l'azote liquide et transférer dans un récipient approprié.
2. Ajouter le tampon d'extraction suivant (25 mL) après l'avoir chauffé dans un bain-marie à environ 65°C, puis broyer au moyen d'un Polytron ou d'un mélangeur Waring pendant 1 min à la vitesse maximale :
   borate de sodium 0,2 M; EGTA 30 mM; SDS 1 %; dithiothréitol 5 mM

   A 80 mL d'eau, ajouter :
   7,6 g de borate de sodium
   1,14 g d'EGTA
   1,0 g de SDS
   0,08 g de dithiothréitol
   Ajuster le pH à 9,0 à l'aide de NaOH 1 N et diluer à 100 mL. Ajouter 50 µL de DEPFC et stocker à 4°C.
   Dans le cas de tissus mûrs de mélèze, on remplace le SDS par du Triton X-100 à 0,1 % à toutes les étapes (Hutchison et collab., 1988).
3. Filtrer le mélange à travers une épaisseur de Miracloth dans un tube à centrifuger en polypropylène de 50 mL. Ajouter de la protéinase K autodigérée (13 mg dans 2 mL de tampon Tris-acétate 10 mM, pH 7,5, pendant 30 min) et incuber à 37°C pendant 1 h.
4. Ajouter 2 mL de KCl 2 M pour précipiter le SDS. Bien mélanger et centrifuger à 10 000 tr/min à 4°C pendant 10 min.
5. Mettre la phase aqueuse dans un autre tube, ajouter 1/4 de vol. de LiCl 10 M et bien mélanger. Congeler à -70°C pendant 20 min, puis conserver à 4°C jusqu'au lendemain.
6. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 20 min, puis laver le culot deux fois avec du LiCl 2 M.
7. Mettre le culot en suspension dans quelques mL de LiCl 2 M et tranférer dans un broyeur de tissus Dounce. Rendre homogène en brisant les amas et transférer dans un tube à centrifuger. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 10 min.
8. Répéter l'étape 7 deux ou trois fois.
9. Laver le culot avec du LiCl 2 M, égoutter le tube et centrifuger brièvement pour recueillir toutes les traces de LiCl qui pourraient rester au fond du tube. Enlever ces traces au moyen d'une pipette muni d'un embout stérile.
10. Dissoudre le culot dans 2 mL d'eau stérile et centrifuger à 10 000 tr/min pendant 10 min. Transférer la solution, qui doit être limpide, dans un tube propre de 15 mL.
11. Ajouter 50 µl d'acétate de sodium 3 M par mL et 2,5 vol. d'éthanol absolu froid. Mettre à -20°C pendant au moins 2 h.
12. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 10 min et ajouter au culot 2 mL de tampon stérile pour extraction au phénol (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; EDTA 1 mM; SDS 0,01 %).
13. Ajouter une quantité égale de phénol saturé de tampon. Agiter pendant plusieurs minutes et centrifuger à 4 000 tr/min pendant 10 min. Recueillir la phase supérieure et la conserver.
14. À la phase inférieure (phénol), ajouter un volume égal de tampon pour extraction au phénol, à pH 9,0; agiter et centrifuger comme ci-dessus. Réunir les phases aqueuses.
15. Extraire les phases aqueuses réunies au moyen d'un volume égal du mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (24:24:1). Agiter pendant plusieurs minutes et centrifuger comme ci-dessus.
16. Extraire deux ou trois autres fois avec le mélange de phénol et de chloroforme.
17. Ajouter 50 µl d'acétate de sodium par mL et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Laisser reposer à -70°C pendant 15 min, puis à -20°C jusqu'au lendemain.

18. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 10 min et jeter le surnageant. Ajouter 2 mL de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), renfermant 1 mM d'EDTA et 0,1 % de SDS. Transférer la solution dans un tube à centrifuger de 15 mL et ajouter 50 µL d'acétate de sodium 3 M par mL et 2,5 vol. d'éthanol froid. Conserver à -20°C pendant au moins 2 h. Pour éliminer les impuretés, notamment les glucides, utiliser la colonne de cellulose Sigmacell Type 50 selon la méthode décrite plus bas.

Colonne de cellulose Sigmacell Type 50 :

1. Mettre quelques grammes de cellulose Sigmacell Type 50 dans un ballon de 25 mL. Laver avec le tampon de liaison 1X. Décanter après quelques minutes. Répéter cette opération de lavage à quelques reprises. Pipetter la pâte dans une colonne jetable à chromatographie Poly-Prep™ (Bio-Rad) de 11 mL jusqu'à l'obtention de 4 cm de garniture. Faire passer quelques mL de tampon de liaison 1X dans la colonne et régler le débit à 1 goutte toutes les 10-12 secondes.
2. Centrifuger l'échantillon à 10 000 tr/min pendant 10 minutes et jeter le surnageant. Ajouter 1 mL de tampon d'élution (pH 7,6) et chauffer à 60°C pendant 5 min. Refroidir dans un bain de glace. Ajouter 1 mL de tampon de liaison 2X. Déposer l'échantillons sur la colonne et commencer à recueillir l'éluant après élimination du premier 1,5 ml. Recueillir 4 mL avec le tampon de liaison 1X comme éluant dans un tube de plastique stérile de 15 mL.
3. Transférer l'échantillon dans un tube à centrifuger de 50 mL. Ajouter 50 µL d'acétate de sodium 3 M par mL et 2,5 volumes d'éthanol froid à 95 %. Garder les tubes à -20°C pendant au moins 2 heures.

Méthode d'extraction no. 2

La méthode suivante est celle décrite par Martin et Northcote (1981).

1. Broyer le tissu dans l'azote liquide et laisser dégeler dans le tampon d'extraction suivant (3 mL/g de tissu) :

   Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM
   NaCl 150 mM
   EDTA 5 mM
   SDS 5% (p/v)

2. Homogénéiser pendant 1 min dans un mélangeur Waring ou broyer dans un mortier renfermant du sable lavé à l'acide, jusqu'à l'obtention d'une pâte fine.
3. Filtrer sur Miracloth et ajouter un volume égal de mélange de phénol redistillé saturé de tampon-chloroforme (1:1). Remuer à 4°C pendant 10 min.
4. Centrifuger à 4000 tr/min pendant 5 min et conserver la phase aqueuse. Extraire à nouveau la phase organique avec 0,25 vol. de tampon de lavage (Tris-HCl 20 mM, pH 9,0; EDTA 2 mM) et centrifuger comme ci-dessus.
5. Réunir les deux phases aqueuses et remuer avec un volume égal de phénol-chloroforme à 4°C pendant 5 min. Centrifuger pour séparer les phases.
6. Extraire au phénol-chloroforme au moins deux autres fois.
7. Porter la concentration en NaCl de la phase aqueuse finale à 0,2 M à l'aide de cristaux de NaCl et précipiter l'ARN au moyen de 2,5 vol. d'éthanol à -20°C jusqu'au lendemain.
8. Centrifuger à 12 000 tr/min à 4°C pendant 10 min et laver au moins trois fois avec de l'acétate de sodium 3 M (pH 5,5) pour éliminer les traces de polysaccharides et l'ARN de faible poids moléculaire (4S et 5S).
9. Laver le culot avec de l'ethanol à 70 % et sécher sous vide. Dissoudre dans l'eau stérile désionisée et reprécipiter l'ARN au moyen de 3 vol. de LiCl à 4°C pendant 16 h.
10. Recueillir le précipité, le laver avec de l'éthanol à 70 % et le sécher sous vide.
11. Dissoudre le culot dans NaCl 0,3 M et éliminer toutes les matières insolubles par centrifugation.
12. Ajouter 2,5 vol. d'éthanol au surnageant et laisser précipiter à -20°C jusqu'au lendemain. Le culot final d'ARN doit être dissous dans l'eau stérile désionisée de façon à obtenir une concentration de 10 mg/mL et conservé à -70°C.

Méthode d'extraction no. 3

Cette méthode, mise au point par Logemann et collab. (1987), sert surtout à extraire l'ARN de tubercules de pommes de terres endommagées renfermant des teneurs élevées en polysaccharides et en nucléases. Mais elle peut aussi être appliquée à d'autres tissus. Nous avons obtenu de bons résultats avec des graines et des tissus de cals de conifères. Cette méthode a également été utilisée pour extrarie l'ARN de petites quantités de tissus (0,2-1 g) par homogénéisation directe dans le tube Eppendorf au moyen d'une tige en acier inoxydable rotative épousant exactement le fond du tube. Cette méthode «miniprep» permet de préparer un grand nombre d'échantillons (environ 10-20/jour). Dans le cas des tissus de tubercules et de feuilles de pommes de terre, Logemann et collab. ont obtenu des rendements pouvant atteindre respectivement 171 et 436 µg d'ARN par g de tissu. Leurs préparations d'ARN étaient intactes et d'une pureté et d'une qualité suffisantes pour la traduction *in vitro*, le clonage de l'ADNc et d'autres études.

1. Broyer les tissus dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre.
2. Homogénéiser (par exemple au moyen d'un Polytron) après l'addition de deux vol. du tampon d'extraction suivant :

   thiocyanate de guanidine 6 M
   Mes (acide 4-morpholineéthanesulfonique) 20 mM
   EDTA 20 mM
   mercaptoéthanol 50 mM
   pH final de 7,0

3. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 10 min.
4. Filtrer le surnageant à travers une épaisseur de Miracloth.
5. Extraire à trois reprises avec un volume du mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1, v:v:v). Le phénol doit avoir été équilibré deux fois avec du tampon Tris-HCl 2 M, à pH 8,0, et conservé en présence de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0.
6. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 45 min à la température ambiante pour séparer les phases.
7. Mélanger la phase aqueuse avec 0,7 vol. d'éthanol et 0,2 vol d'acide actique 1 M refroidis pour précipiter l'ARN (l'ADN et les protéines résiduelles restent dans le surnageant). Conserver à -70°C pendant 1 heure ou à -20°C jusqu'au lendemain.
8. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 10 min et laver au moins deux fois avec de l'acétate de sodium 3 M stérile (pH 5,2) à la température ambiante. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 5 min. L'ARN se retrouve dans le culot alors que les traces de polysaccharides et l'ARN de faible poids moléculaire restent en solution.
9. Laver le culot d'ARN avec de l'éthanol à 70 %. Conserver l'ARN dans l'éthanol à -70°C.

Méthode d'extraction no. 4

Cette méthode est essentiellement celle qui a été décrite par Lay-Yœ et collab. (1987) pour l'extraction des cotylédons de *Pharbitis nil* Choisy cv. Violet. L'ARN obtenu peut être utilisé pour les études de traduction *in vitro*.

1. Broyer 5 g de tissu jusqu'à l'obtention d'une poudre et ajouter 35 mL du tampon suivant :

   thyocyanate de guanidine 6 M
   EDTA 10 mM
   Tris-HCl 200 mM, pH 8,0
   2-mercaptoéthanol 8 % (v/v)

2. Homogénéiser dans un mélangeur à la température ambiante.
3. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 20 min, puis ajouter sept volumes de LiCl 4 M au surnageant. Conserver à 4°C jusqu'au lendemain.
4. Recueillir l'ARN précipité par centrifugation à 11 000 tr/min pendant 90 min. Remettre le culot en suspension et centrifuger en présence de LiCl 3 M au moins une fois.
5. Remettre le culot en suspension dans le tampon de solubilisation suivant :

   Tris-HCl 10 mM (pH 8)
   EDTA 5 mM
   SDS 1 %

6. Extraire au moins trois fois avec un volume égal du mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1, v/v/v/).
7. Ajouter à la fraction aqueuse 1/10 de vol. d'acétate de sodium 3 M et 2,5 vol. d'éthanol froid. Conserver à -80°C.
8. Avant d'isoler l'ARN poly $(A)^+$, dissoudre la préparation d'ARN total dans le tampon de solubilisation ci-dessus, porter la concentration de NaCl à 0,5 M, chauffer à 65°C pendant 5 min, refroidir rapidement jusqu'à la température ambiante dans un bain de glace, puis purifier sur une colonne de cellulose CF11 (Whatman) équilibrée avec du tampon Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) renfermant 0,5 M de NaCl, 1 mM d'EDTA et 0,1 % de SDS, pour éliminer les traces de polysaccharides.

Méthode d'extraction no. 5

Cette méthode, décrite par Reeves et collab. (1986), s'applique à l'extraction de l'ARN total des grains de blé (*Triticum aestivum* L.).

1. Pour chaque g de graines, broyer dans l'azote liquide et mettre en suspension dans 10 mL de tampon qui renferme les composants suivants :

   chlorhydrate de guanidine 4 M
   Tris-HCl 10 mM, pH 8,0
   EDTA 10 mM
   sarcosyl 0,5 % (p/v)
   PVPP 3 % (p/v)

2. Extraire avec le mélange phénol-chloroforme.
3. Précipiter les acides nucléiques à -20°C pendant 2 h en ajoutant 1/100 de vol. d'acétate de sodium 3 M (pH 4,8) et de l'éthanol.
4. Centrifuger à 12 000 tr/min pendant 10 min et mettre le culot en suspension dans sarcosyl à 1 % renfermant 100 µg de protéinase K par mL à l'aide d'un homogénéiseur verre-téflon en réchauffant à 50°C.
5. Pour chaque 2,5 mL, ajouter 1 g de CsCl et centrifuger la solution à 20 000 tr/min à 20°C pendant 16 h.
6. Dissoudre le culot dans un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) renfermant 100 mM de NaCl et 0,5 % de SDS et précipiter à l'éthanol.

Méthode d'extraction no. 6

Cette méthode, mise au point par Hughes et Galau (1988), servait principalement à extraire l'ARN des feuilles et du pollen du coton (*Gossypium hirsutum*). La méthode peut toutefois être appliquée à d'autres tissus et espèces pour lesquelles une extraction au phénol ou au guanidine ne conviendrait pas. Les auteurs ont indiqué que dans le cas du coton, l'ARN se lie de façon irréversible aux tissus homogénéisés des feuilles en présence de phénol ou de guanidine. Leur méthode modifiée donne de grandes quantités d'ARN dans le précipité obtenu par traitement de l'extrait brut à l'isopropanol. On augmente le rendement en ajoutant du désoxycholate, du NP-40 et des concentrations élevées de LiCl. L'utilisation d'acétate de potassium acide augmente la récupération de l'ARN, élimine les impuretés visibles et décolore l'homogénat clarifié.

1. Homogénéiser (en utilisant par exemple un broyeur de tissus Duall de 30 mL; Kontes, Vineland, NJ) 0,8 g (poids frais) de tissus de feuilles avec 10 mL du tampon d'homogénéisation suivant, conservé sur glace :

   Tris-HCl 200 mM, pH 8,5 (à la température ambiante)
   dodécylsulfate de lithium 1,5 %
   LiCl 300 mM
   EDTA disodique 10 mM
   désoxycholate de sodium 1 % (p/v)
   NP-40 1 % (v/v)
   thiourée 5 mM
   acide aurine-tricarboxylique 1 mM
   dithiothréitol 10 mM

Les solutions sont préparées à partir des solutions mères filtrées à travers une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm, agitées en présence de 0,1 % de DEPC pendant 30 min, puis passées à l'autoclave.

Transférer le mélange ci-dessus dans un tube à centrifuger conique en plastique de 15 mL et laisser congeler lentement à -80°C.

2. Mettre le tube dans un bain-marie à 37°C seulement le temps nécessaire pour en dégeler le contenu. Mettre immédiatement le tube dans un mélange d'eau et de glace et ajouter 1/3 de volume d'acétate de potassium 8,5 M, pH 6,5. Mélanger en retournant et garder sur glace pendant 15 min. Centrifuger à 5 000 tr/min pendant 20 min. Filtrer la phase aqueuse à travers une épaisseur de Miracloth dans un autre tube à centrifuger conique de 15 mL. Ajouter 1/9 de volume d'acétate de sodium 3,3 M, pH 6,1 et la moitié du volume final d'isopropanol froid. Mélanger et garder à -20°C pendant au moins 1 h.
3. Centrifuger à 5 000 tr/min pendant 30 min et remettre le culot en suspension dans 800 µL de TE, puis transférer dans un microtube à centrifuger de 1,5 mL. Ajouter 1/4 de volume de LiCl 10 M pour obtenir 2 M et incuber sur glace pendant 5 à 12 h.
4. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 30 min et remettre le culot en suspension dans 200 µL de TE. Ajouter 1,5 volume d'acétate de potassium 5 M (pH non ajusté), mélanger et garder sur glace de 3 à 5 h.
5. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 30 min et remettre le culot en suspension dans 100 µL de TE et incuber sur glace pendant 1 h, en passant au vortex de temps en temps. Centrifuger comme ci-dessus et mettre le surnageant dans un autre microtube à centrifuger. Ajouter 1/9 de volume d'acétate de sodium 3,3 M, pH 6,1 et deux volumes d'éthanol. Mélanger et garder à -20°C pendant au moins 1 h. On peut, au besoin, extraire la phase aqueuse ci-dessus au phénol-chloroforme et au chloroforme.
6. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 30 min et laisser s'égoutter la phase aqueuse. Sécher le culot sous vide et dissoudre dans 50 à 100 µL de TE.

3.5 Autres méthodes d'extraction de l'ARN

Il existe diverses autres méthodes pour extraire l'ARN de tissus végétaux en utilisant d'autres types de tampons, d'autres méthodes d'homogénéisation. Les étapes des procédés peuvent aussi être exécutées dans un ordre différent. Voici quelques exemples :

Pour extraire l'ARN des semis de luzerne (*Medicago falcata*), Mohapatra et collab. (1987) ont utilisé un tampon d'extraction à pH peu élevé (acétate de sodium 200 mM, pH 5,2, EDTA 10 mM, SDS 1 mM). Les semis étaient broyés dans l'azote liquide, puis la poudre était extraite avec deux volumes de tampon et deux volumes de phénol (les deux à 60°C). Après centrifugation à 6 000 tr/min, la phase aqueuse était à nouveau extraite avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique et un mélange de chloroforme-alcool isoamylique. L'ARN était précipité pendant une nuit à 4°C au moyen de LiCl (conc. finale de 2 M), puis le précipité était lavé une fois avec du LiCl 2 M et deux fois avec de l'éthanol à 70 %.

On a extrait l'ARN total d'embryons de riz (*Oryza sativa*) par broyage dans un mortier froid dans un tampon Tris-HCl 0,02 M (pH 7,6) renfermant 0,5 M de KCl, 2 mM de $MgCl_2$, 0,5 % de SDS, 0,5 % de bentonite et 0,05 M de β-mercaptoéthanol (Ghosh et Chaudhuri, 1984). Après l'extraction de la phase aqueuse avec du phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol, on a dissous le culot d'ARN dans un tampon Tris-HCl 0,01 M (pH 7,6) renfermant 0,3 M de NaCl et on l'a traité à la DNase P (50 µg/mL) à 37°C pendant 1 h. Après d'autres extractions au phénol-chloroforme, on a précipité l'ARN présent dans la phase aqueuse à l'éthanol et on l'a dissous dans le tampon avant de la soumettre à une chromatographie sur oligo(dT)-cellulose.

Chrispeels et collab. (1984) ont broyé 1-3 g de cotylédons de *Phaseolus vulgaris* dans l'azote liquide, transféré le broyat dans un autre mortier à la température ambiante et l'ont broyé à nouveau jusqu'à l'obtention d'une pâte dans un mélange de 10 mL renfermant 0,33 M de sucrose, 30 mM de $MgCl_2$, 60 mM de KCl, 0,1 M de Tris-HCl (pH 8,5), 2 mM d'EDTA et 1 % d'acide iodoacétique. Après une centrifugation à 13 000 tr/min. pendant 10 min., ils ont ajouté 0,5 % de SDS et ils ont extrait le surnageant une fois avec un volume égal de phénol, deux fois avec un mélange de phénol-chloroforme et une fois avec du chloroforme. Pour éliminer les polysaccharides, ils ont ajouté de l'acétate de sodium pour obtenir une concentration de 0,3 M ainsi que 10 % d'éthanol et ont incubé sur glace pendant 1 h avant de centrifuger à 20 000 tr/min pendant 20 min. Ils ont prélevé soigneusement la phase aqueuse et ils ont précipité l'ARN avec 2,5 volumes d'éthanol. Après une centrifugation, ils ont remis le culot en suspension dans l'eau et ont reprécipité l'ARN avec quatre volumes d'acétate de sodium 3 M, à pH 5,5. Le précipité final a été lavé à l'acétate de sodium 3 M et à l'éthanol à 70 %.

Pour extraire l'ARN total des hypocotyles de soja (*Glycine max*) en élongation, Walker et collab. (1985) ont homogénéisé le tissu au moyen d'un Polytron dans un tampon d'extraction renfermant 10 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM de NaCl, 6 % (p/v) d'acide p-aminosalicylique, 2 % (p/v) d'acide tri-isopropylnaphtalènesulfonique et 6 % (v/v) de butanol. Cette étape était suivie d'extractions répétées au phénol-chloroforme. Ce procédé est le même que celui qui a été décrit par Parish et Kirby (1966).

Pour extraire l'ARN total des cotylédons de graines de moutarde (*Sinapis alba*), Sharma et Schopfer (1987) ont mélangé la poudre obtenue après broyage dans l'azote liquide à tampon NETS (0,12 M de NaCl; 10 mM d'EDTA, 25 mM de Tris-HCl (pH 7,4) et 15 g/L de SDS et 0,2 g/L de protéinase K) à raison de 10 mL de tampon par g de tissu frais. Ils ont incubé l'homogénat à 37°C pendant 1 h en agitant de temps en temps, puis ils l'ont extrait à quelques reprises avec du phénol-chloroforme. Après précipitation de l'ARN à l'éthanol, ils ont éliminé le phénol résiduel en dissolvant le culot dans un tampon ETS (0,5 mM d'EDTA, 20 mM de Tris-HCl, pH 7,4 et 2 g/L de SDS) et en reprécipitant à l'éthanol. L'ADN a été éliminé par extraction répétée avec 3 mM d'acétate de sodium (pH 5,2).

Pour extraire l'ARN des embryons de pin (*Pinus thunbergii*), Yamamoto (1982) a homogénéisé les embryons dans un mélangeur Waring pendant 3 min. dans 50 mM de Tris (pH 9,0), 1 % de SDS et un volume égal de phénol saturé d'eau. Après une agitation de 5 min et une centrifugation à 900 tr/min pendant 5 min, la phase aqueuse a été extraite trois fois avec du phénol. La phase phénolique et la phase intermédiaire ont été extraites à nouveau. Après la précipitation de l'ARN à l'éthanol et la dissolution du culot dans l'eau, l'ADN ainsi que l'ARN de poids moléculaire faible ont été enlevés après que l'on eut précipité l'ARN de poids moléculaire élevé au moyen de 0,2 volumes de 10 M LiCl 0,2 M à 0°C pendant une nuit.

Dans le cas des graines de radis (*Raphanus sativus*), on a réduit le tissu en poudre dans l'azote liquide, puis on a ajouté un tampon d'extraction renfermant 0,1 M de glycine-NaOH (pH 9,0), 0,15 M de NaCl, 1 % de désoxycholate, 0,1 % de SDS et de la protéinase K à raison de 60 µg/mL (Aspart et collab., 1984). On a ajouté un volume égal de phénol-chloroforme, homogénéisé le mélange pendant 2 min dans un mélangeur Waring et agité pendant 15 min à 4°C. Après une centrifugation à 8 000 tr/min. pendant 15 min., on a ajouté de la protéinase K au surnageant à raison de 20 µg/mL et on a agité le mélange avec du phénol-chloroforme à 45°C pendant 15 min. Après la centrifugation, d'autres extractions au phénol-chloroforme et la précipitation à l'éthanol, on a dissous le culot dans un tampon stérile renfermant 20 mM de Tris-HCl (pH 9,0), 0,15 M de NaCl et 0,1 % de SDS. On a ensuite ajouté du NaCl 4 M ou de l'acétate de sodium 4 M (pH 7,0) pour obtenir une concentration finale de 3 M et on a laissé précipiter l'ARN de poids moléculaire élevé à 0°C 2 à 5 h après. Ce traitement éliminait également des inhibiteurs non identifiés de la traduction, l'ADN, l'ARN de faible poids moléculaire et les polysaccharides.

Dolferus et collab. (1985) ont broyé des tissus d'*Arabidopsis* dans l'azote liquide qu'ils ont ensuite ajoutés à 10 vol de Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA et 0,1 % de SDS. Ils ont ensuite ajouté un volume égal de phénol-chloroforme et ont effectué l'extraction dans un mélangeur Waring. Après la centrifugation à 10 000 tr/min à 10°C pendant 30 min, ils ont extrait à nouveau à plusieurs reprises la phase aqueuse avec du phénol-chloroforme. Ils ont précipité l'ARN à l'éthanol et ont dissous le culot dans 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM d'EDTA et 0,5 % de SDS. Ils ont précipité l'ARN de poids moléculaire élevé par addition d'un volume égal de LiCl 4 M et ont laissé reposer à -20°C jusqu'au lendemain.

Smith et collab. (1985) ont broyé des feuilles de tomate (*Lycopersicon esculentum*) dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre qu'ils ont ajoutée à quatre vol. de tampon renfermant 5 % (p/v) d'acide 4-aminosalicylique, 1 % (p/v) d'acide triisopropylnaphtalènesulfonique, 5 % (v/v) d'un mélange de phénol (400 mL d'eau, 140 mL de m-crésol, 1 g de 8-hydroxyquinoline ajoutés à 1 kg de phénol) et 50 mM de Tris-HCl (pH 8,5). Ils ont extrait l'homogénat avec un volume égal de phénol-chloroforme, puis ils l'ont agité à la température ambiante et centrifugé. Ils ont ensuite effectué une autre extraction au phénol-chloroforme et une précipitation finale de l'ARN de poids moléculaire élevé au moyen d'acétate de sodium 3 M (pH 6,0).

Des grains d'orge (*Hordeum vulgare*) à l'embryon excisé ont été congelés dans l'azote liquide, puis broyés

jusqu'à l'obtention d'une poudre dans un mélangeur Waring refroidi (Mozer, 1980). La poudre a ensuite été ajoutée à un tampon renfermant 100 mM de glycinate de sodium (pH 9,5), 100 mM d'EDTA, 100 mM de NaCl, 1 % de SDS, 1 % de PVPP, 5 mM de 2', 3'-AMP, 10 mM de mercaptoéthanol et 10 µg/mL de protéinase K. Après la centrifugation de l'homogénat, le surnageant a été extrait deux fois avec du phénol-chloroforme, additionné de 1/10 de vol. d'acétate de sodium 1 M (pH 5,0) et d'une quantité suffisante d'acide acétique pour abaisser le pH à 5,0. Après centrifugation, le culot, renfermant l'ARN et des polysaccharides, a été remis en suspension dans 20 mM de Tris-HCl (pH 7,6) renfermant 0,5 % de SDS. Cette solution a alors été chauffé à 60°C pendant 5 min, puis refroidie rapidement et additionnée d'un volume égal d'acétate de sodium 1 M. L'échantillon a alors été purifié sur une colonne de cellulose Sigmacell type 50 pour éliminer la grande quantité de glucides qui se lient de façon non spécifique à la cellulose en présence d'une concentration élevée en sel et qui sont élués avec une faible concentration de sel.

Pour extraire de l'ARN de différents tissus de tomate (fruit, tige, racine, feuillage, semis), 50 g de tissus congelés et broyés ont été mélangés dans 50 mL de tampon comprenant 0,35 M de sorbitol, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM d'EDTA, 15 mM de 2-mercaptoéthanol, 2 mM de dithiothréitol, 0,1 % de PVP et 5 mM d'acide aurine-tricarboxylique (Piechulla et collab., 1986). Après addition d'un dixième de volume de tampon pour lyser les chloroplastes (5 % de laurylsarcosinate de sodium, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM d'EDTA), le mélange a été gardé à la température ambiante pendant 15 min., puis soumis à trois extractions au phénol-chloroforme suivies d'une précipitation de l'ARN au moyen de 1/10 de vol. d'acétate d'ammonium 5 M (pH 5,2) et de deux vol. d'éthanol. Le culot a été mis en suspension dans un TE et 10 M de LiCl ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 2 M, dans le but de précipiter l'ARN de poids moléculaire élevé.

Des feuilles de *Mesembryanthemum crystallinum* congelées ont été broyées dans un tampon TNE stérile (100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM de NaCl, 10 mM d'EDTA) renfermant 2 mM d'acide aurinetricarboxylique et le broyat a été filtré sur Miracloth (Ostrem et collab., 1987). Du SDS a été ajouté au filtrat à raison de 1 % (p/v). Le filtrat a été mélangé avec un volume égal de phénol (500 g/200 mL d'eau) renfermant 0,1 % (p/v) 8-hydroxyquinoline. Après 1-2 h à 4°C avec agitation intermittente, la phase aqueuse a été receuillie et extraite deux fois avec un volume égal de chloroforme. On a ensuite ajouté de l'acétate d'ammonium (conc. finale de 0,3 M) et un volume égal d'isopropanol. Après un séjour d'une nuit à -20°C, le culot a été dissous dans l'eau stérile traitée au DEPC. l'ARN total a été récupéré par deux précipitations en présence de 2 M de LiCl. Les culots d'ARN ont été redissous et précipités à nouveau.

Pour extraire l'ARN des épinards (*Spinacia oleracea*), on a rincé 20 g de tissu dans l'eau distillée, on les a épongé, haché à l'aide d'une lame de rasoir, puis homogénéisé dans 50 mL de tampon d'extraction (100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM de NaCl, 5 mM d'EDTA, 1 % de N-laurylsarcosine, 40 unités d'héparine par mL) au moyen d'un Polytron pendant cinq périodes de 1 min (entrecoupées de périodes de 1 min) de refroidissement sur glace (Guy et collab., 1985). Puis, on a soumis l'homogénat à des extractions au phénol-chloroforme, et le culot d'ARN a été lavé par la suite avec de l'acétate de sodium 3 M (pH 5,5).

Des feuilles de maïs (*Zea mays* L.) ont été broyées dans l'azote liquide et 25 g ont été mélangées avec 100 mL de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) renfermant 10 mM d'EDTA, 5 M de thiocyanate de guanidinium, 2 % (p/v) de N-laurylsarcosine et 5 % (v/v) de 2-mercaptoéthanol (Commere et collab., 1986). Le mélange a été gardé à 37°C pendant 15 min, puis centrifugé à 20 000 tr/min pendant 30 min. Le culot a été traité comme ci-dessus dans 50 mL du même milieu. Les surnageants ont été réunis, leur concentration en CsCl a été portée à 0,1 mg/mL et ils ont été déposés sur 8 mL de CsCl 5,7 M renfermant 50 mM d'EDTA (pH 8,0) dans des tubes de 30 mL. Après la centrifugation à 25 000 tr/min pendant 24 h dans un rotor SW 27 à 15°C, le culot d'ARN a été remis en suspension dans 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) renfermant 1 mM d'EDTA et 0,1 % (p/v) de SDS, puis chauffé pendant 10 min à 65°C. L'ARN a été précipité au moyen de 0,1 vol. d'acétate de sodium 3 M (pH 6,0) et de 2,2 vol. d'éthanol.

Des tissus d'orge germée (*Hordeum vulgare*) ont été broyés dans l'azote liquide et additionnés de 10 vol. de Tris-HCl 10 mM (pH 8,5) renfermant 5 M de chlorure de guanidine, 5 mM d'EGTA, 100 mM de mercaptoéthanol, 0,1 % de laurylsarcosine et 0,001 % d'octanol. La suspension a été homogénéisée à pleine vitesse pendant 2,5 min dans un Omnimixer de Sorvall. Les débris ont été éliminés par centrifugation et les matières polymériques ont été précipitées avec 0,75 vol. d'éthanol à -20°C pendant 16 h. Le culot a été remis en suspension dans du citrate de trisodium 25 mM (pH 7,0) renfermant 5 M de chlorure de guanidine, 5 mM de DTT et 10 mM d'EDTA, précipité avec 0,5 vol. d'éthanol, séché et redissous dans 100 mM de Tris-HCl (pH 9,0) renfermant 100 mM de NaCl et 2 mM d'EDTA. Des extractions à l'aide d'un mélange de phénol (saturé du même tampon) et de chloroforme ont été effectuées et l'ARN a été précipité.

Il existe des méthodes pour extraire de l'ARN d'aussi peu que 100 mg de tissus (ou de cultures de cellules). Il semble que ce soit suffisant pour une analyse par transfert à la touche («dot blot») et pour une analyse par transfert de Northern (Davis et collab., 1986). Dans l'une des méthodes, le tissu est homogénéisé à vitesse moyenne avec un Polytron pendant 15 sec dans le tampon d'extraction suivant : 100 µL d'acétate de sodium 3 M (pH 6), 20 µL d'EDTA 0,5 M, 20 µL de complexe vana-

dyle-ribonucléoside (BRL), 100 µL de solution d'héparine (10 mg/mL) et 500 µL d'eau. On ajoute alors 100 µL de SDS à 10 % puis on le passe au vortex, après quoi l'on effectue plusieurs extractions au phénol-chloroforme.

Certaines compagnies (par exemple Invitrogen, BRL) ont récemment mis sur le marché des kits d'isolement de l'ARNm servant à isoler de l'ARN poly $(A)^+$ intact directement à partir des cellules ou des tissus.

4. Préparation et caractérisation de l'ARN poly $(A)^+$ (ARNm)

4.1 Caractérisation de l'ARNm

L'ARN messager (ARNm) ne représente qu'environ 1 à 4 % de l'ARN total. Chaque ARNm ne code que pour un seul polypeptide et leur taille varie de quelques centaines à plusieurs milliers de nucléotides, selon la taille des protéines pour lesquelles ils codent. L'enzyme ARN polymérase II participe à la transcription des gènes d'ARNm. De nombreux ARNm de plantes, sauf peut-être l'ARNm des chloroplastes, renferment une structure 5' en chapeau, une liaison 5'-5' triphosphate mettant en jeu un résidu 7-méthylguanine qui s'ajoute après la transcription. La structure 5' en chapeau peut jouer un rôle dans la régulation du début de la synthèse des protéines. La plupart des ARNm des plantes ont une région polyadénylée (poly-A) à l'extrémité 3' qui peut mesurer jusqu'à 250 nucléotides de long. Les ARNm plus «âgés» peuvent avoir des extrémités 3' polyadénylées plus courtes. Elles s'ajoutent après la synthèse par une poly A-polymérase dans le noyau. Toutefois, contrairement à l'ARNm du noyau et l'ARN mitochondrial des animaux, les transcripts provenant de mitochondries de plantes ne renferment pas d'extrémités polyadénylées (Clayton, 1984). On peut les retenir sur des colonnes d'oligo (dT)-cellulose, probablement à cause des régions internes riches en A. Dans des études sur *Oenothera*, l'addition d'un fragment oligo A à l'extrémité 3' des transcripts mitochondraux s'est révélée nécessaire à la réaction de transcriptase inverse (Hiesel et Brennicke, 1987). Outre la région codante, l'ARNm renferme des nucléotides non traduits de longueur variable à chacune des extrémités. Certains gènes ont également des nucléotides qui codent pour environ 18-60 acides aminés, à l'extrémité N-terminale d'une protéine, qui ne se retrouvent pas dans les protéines mûres. Ces acides aminés participent à titre de peptides signal ou transitoires. Ainsi, plus d'une centaine de protéines de chloroplastes sont d'abord codées dans le noyau, traduites dans le cytosol avec des peptides transitoires, puis transportées à travers la double membrane des chloroplastes. Enfin, le peptide transitoire est scindé par une protéase soluble dans le stroma du chloroplaste.

De nombreux transcripts d'ARNm sont présents sous forme de familles multigéniques composées de deux à 100 gènes apparentés mais non identiques. Ces familles multigéniques sont probablement formées par duplication de gènes et divergence sur suite de mutations. Le génome peut renfermer des pseudo-gènes (gènes incomplets) et des gènes inactivés par des éléments d'insertion (transposables). Des gènes, comme celui de l'actine du pin lodgepole (*Pinus contorta*) (Kenny et collab., 1988) peuvent renfermer des séquences interposées (introns) qui séparent les régions codant les acides aminés. Les introns renferment habituellement les bases GU et AG à leurs extrémités gauche et droite. Après la transcription, les introns sont coupés par des enzymes dans le nucléole et les séquences codantes (exons) sont réunies ensemble. Le nombre d'introns varie selon les gènes; certains peuvent en renfermer jusqu'à 50, et leur taille peut varier de 10 à 1000 pb. Certaines séquences introniques peuvent comporter des structures ouvertes.

4.2 Séparation de l'ARNm de l'ARNr

Méthode 1 : chromatographie sur oligo (dT)-cellulose

La plupart des molécules d'ARN eucaryote renferment des séquences de poly (A) à l'extrémité 3' dont la longueur peut aller jusqu'à 250 bases. Dans des conditions de concentrations élevées en sel (0,3-0,5 M en NaCl ou KCl), le poly A peut s'hybrider à l'oligo (dT)-cellulose ou bien au poly (U)-sépharose. Ces deux substances sont des polymères comptant environ 10 à 20 nucléotides liés à un support glucidique par des liaisons covalentes et qui fixent l'ARN pouvant renfermer des séquences de poly A comptant aussi peu que 20 résidus. L'ARN ribosomique et l'ARN de transfert ne renferment pas de séquences de poly A et ne se fixent donc pas sur la colonne. Après avoir lavé la colonne à fond, on peut récupérer l'ARNm par élution avec un tampon à faible teneur en sel. Toutefois, la liaison du poly A étant plus forte sur les colonnes de poly (U)-sépharose, il faut, dans ce cas, un éluant plus puissant; on ajoute par exemple de la formamide au tampon d'élution. La méthode comprend une étape facultative du traitement au chaud pour diminuer l'agrégation de l'ARN avant la chromatographie, et on prend la précaution d'ajouter du SDS aux tampons pour inhiber les ribonucléases.

Matériel

1. Tampons de liaison et d'élution (voir l'Annexe I).
2. Mettre 1,0 g d'oligo (dT)-cellulose en suspension dans un tampon de liaison 1X et pipetter la pâte dans une colonne à chromatographie «Poly-Prep» jetable en polypropylène d'une capacité de 11 mL. Laver la colonne avec 20 mL de tampon de liaison 1X et ajuster le débit à 10 mL/h. Un gramme d'oligo (dT)-cellulose fixe 20 à 40 unités de poly A à 260 nm.

Procédé

1. Centrifuger l'échantillon à 10 000 tr/min pendant 10 min et sécher le culot sous vide pendant

quelques minutes. Dissoudre l'échantillon dans 1 mL de tampon d'élution (environ 200 µg d'ARN/mL).

2. Chauffer la solution à 65°C pendant 5 min, refroidir, ajouter 1 mL de tampon de liaison 2X et bien mélanger. Chauffer l'ARN pour rompre toute structure secondaire qui aurait pu se former.
3. Déposer l'échantillon sur la colonne et éluer avec du tampon de liaison 1X. Recueillir 24 mL d'effluent.
4. Repasser deux fois l'ARN sur la colonne, après le chauffage de l'échantillon à 65°C pendant 5 min et le refroidissement. Il faut procéder ainsi pour s'assurer que la plus grande partie du poly $(A)^+$ se fixe à la colonne. Jeter le dernier effluent.
5. Laver la colonne avec le tampon de liaison 1X.
6. Éluer le poly $(A)^+$ RNA avec le tampon d'élution à pH 7,6. Recueillir et jeter 1 mL. Recueillir 12 mL d'ARN poly $(A)^+$.
7. Laver la colonne avec le tampon de liaison 1X (environ 3 volumes), puis avec du NaOH 0,1N jusqu'à un pH fortement basique (2-3 volumes), puis avec du tampon de liaison 1X (5-7 volumes).
8. Purifier plus à fond l'ARN poly $(A)^+$ obtenu à l'étape 6 en répétant les étapes 2, 3, 5 et 6.
9. Ajouter 50 µL/mL d'acétate de sodium 3M (pH 5,5), puis de l'éthanol froid à 95 %. Garder à -20°C au moins 2 h.
10. Recueillir l'ARN par centrifugation à 10 000 tr/min pendant 10 min et laver le culot au moins deux fois avec de l'éthanol à 70 % à la température ambiante pour éliminer le SDS. Conserver le précipité sous alcool à -20°C (ou à une température inférieure).

Conservation de l'oligo (dT)-cellulose

1. Laver la colonne avec environ 3 volumes de tampon de liaison 1X.
2. Laver la colonne avec du NaOH 0,1 M jusqu'à un pH fortement basique (2-3 volumes).
3. Laver la colonne avec du tampon de liaison 1X et de l'azoture de sodium à 0,02 % jusqu'à l'obtention d'un pH de 7,6 (5-7 volumes).
4. Conserver la colonne en présence de cette solution à 4°C. La colonne peut être réutilisée indéfiniment.

Remarque : Le SDS est un sel de sodium relativement insoluble et peut avoir tendance à ralentir le débit de la colonne. On peut éviter cet inconvénient en remplaçant le chlorure de sodium par le chlorure de lithium dans les tampons. On trouvera plus de détails sur cette méthode en consultant Ausubel et collab. (1989).

Méthode 2 : Purification de l'ARNm par transfert sur papier «Hybond-mAP» (Amersham)

Cette méthode est essentiellement celle qui est décrite par les fabricants.

1. Les mains gantées, couper un morceau de Hybond-mAP de la taille requise à l'aide des ciseaux ou d'un scalpel. La capacité du papier est d'environ 30-40 µg d'ARNm par cm^2. On utilise habituellement 1 cm^2 par mg d'ARN total.
2. Humidifier le papier mAP avec du NaCl 0,5 M (passé à l'autoclave). Chauffer l'ARN dans l'eau distillée à 60°C pendant 5 min et refroidir sur glace. Ajouter suffisamment de NaCl pour obtenir une concentration finale de 0,5 M. La concentration de l'ARN devrait être d'environ 1 mg/mL.
3. Mettre le papier Hybond-mAP sur quelques épaisseurs de papier filtre (3 MM) coupés à la taille exacte du papier Hybond-mAP pour s'assurer que la solution d'ARN passe bien à travers le papier mAP. Ajouter lentement la solution d'ARN.
4. Laver le mAP avec trois volumes de 5 mL de NaCl 0,5 M par cm^2 pendant 10 minutes chaque fois. On peut utiliser un agitateur rotatif.
5. Rincer le papier Hybond-mAP dans l'éthanol à 70 % (v/v) pendant 2 min, puis éponger à sec avec un papier 3 MM.
6. Transférer le papier Hybond-mAP dans le volume minimum d'eau bidistillée stérile nécessaire pour le recouvrir et incuber à 70°C dans un bain-marie pendant 5 min.
7. Retirer le papier mAP à l'aide de pincettes stérilisées. L'ARN poly $(A)^+$ reste en solution dans l'eau. Il faut répéter l'opération d'isolement en ajustant à 0,5 M la concentration de NaCl dans la solution d'ARNm obtenue et en déposant cette solution sur un autre morceau de papier Hybond-mAP humidifié.

4.3 Électrophorèse des ARNm sur gels d'agarose

On analyse habituellement les extraits d'ARN par électrophorèse sur gels d'agarose renfermant du formaldéhyde. Cette opération sert à déterminer la quantité d'ARN ribosomique (r) et d'ARN de transfert (t) qui contamine l'extrait. Même après deux chromatographies sur oligo (dT)-cellulose, l'ARNm renferme une certaine quantité d'ARNr. Même dans ce cas, la netteté des bandes indique si l'ARNm est dégradé dans une certaine mesure. Les classes d'ARN végétal 25S et d'ARNr 18S doivent former des bandes étroites, alors que l'ARNm [ARN poly $(A)^+$] apparaît sous forme d'une traînée après la coloration des gels au bromure d'éthidium ou la coloration de la membrane de nylon au bleu de méthylène après le transfert de Northern.

Méthodes :

La méthode suivante est essentiellement celle qui est décrite par Fourney et collab. (1988).

Tampons

Tampon MOPS/EDTA 10X :

MOPS [acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique] 0,2 M acétate de sodium 50 mM
EDTA 10 mM
Ajuster le pH à 7,0 et passer à l'autoclave

Tampon de solubilisation de l'échantillon pour l'électrophorèse :
0,75 mL de formamide désionisée
0,15 mL de MOPS 10X
0,24 mL de formaldéhyde (37 %)
0,1 mL d'eau désionisée exempte de RNase
0,1 mL de glycérol
0,8 mL de bleu de bromophénol à 10 % (p/v)
Préparer une solution fraîche ou conserver à -20°C en petites portions

Tampon pour électrophorèse :
tampon MOPS/EDTA 1X

Préparation de l'échantillon

1. Dissoudre l'ARN dans 25 mM d'EDTA et 0,1 % de SDS.
2. Mettre 1-3 µg d'ARN poly $(A)^+$ ou 10-30 µg d'ARN total dans un microtube à centrifuger.
3. Ajuster le volume à 5 µL avec de l'eau traitée au DEPC et passée à l'autoclave.
4. Ajouter 25 µL de tampon de solubilisation de l'échantillon pour l'électrophorèse et chauffer à 65°C pendant 15 min pour dénaturer l'ARN.
5. Ajouter 1 µL d'une solution de bromure d'éthidium (1 mg/mL dans l'eau désionisée exempte de RNase).
6. Déposer l'échantillon sur le gel. On peut ajouter des marqueurs (par exemple ARN de 0,16-1,77 Kb de BRL).

Préparation du gel et l'électrophorèse

1. Mettre 1-1,5 g d'agarose, 10 mL de MOPS 10X et 87 mL d'eau traitée au DEPC et passée à l'autoclave dans un ballon exempt de RNase.
2. Dissoudre l'agarose et laisser refroidir à 50°C.
3. Dans une hotte, ajouter 5,1 mL de formaldéhyde à 37 % à la solution d'agarose, mélanger doucement et verser dans une boîte à gel.
4. Laisser reposer le gel pendant 1 h avant de l'utiliser.
5. Avant de charger le gel, laver les puits à échantillon avec du tampon à électrophorèse en déposant et en aspirant successivement le tampon à l'aide d'une pipette.
6. Déposer l'échantillon dans les puits et procéder à l'électrophorèse à 30 V (voltage constant) à la température ambiante pendant 18 h. D'autres chercheurs ont utilisé des voltages plus élevés, par exemple, 100 V pendant 2-3 h. Le colorant migre jusqu'à environ 10 cm dans le gel.
7. Pour 10 µg d'ARN total, photographier à 302 nm ou à 254 nm en utilisant un filtre jaune (par exemple Kodak Wratten no. 19) et un film Polaroid du type 665 PN pendant 4 sec à f4,5.

4.4 Transfert de Northern

1. Faire tremper le gel pendant deux périodes de 20 min dans 500 mL de SSC 10X à la température ambiante en agitant doucement. Si le gel est épais ou si une concentration élevée d'agarose (>1,3 %) est utilisée, faire tremper le gel pendant 10-20 min dans un SSC 1X renfermant 0,05 M de NaOH.
2. Préhumidifier la membrane de nylon dans l'eau distillée pendant 5 min, puis faire tremper dans un SSC 10X pendant 5 min.
3. Transférer l'ARN (~8 h) dans le SSC 10X à l'aide d'une éponge (à petits pores ou fabriquée à partir de mousse de polyuréthane) placée dans la solution pour augmenter l'action capillaire. Les autres couches comprennent 3 épaisseurs de papier 3 MM, le gel, la membrane de nylon, trois épaisseurs de papier 3 MM, 3-4 cm de papier absorbant, une plaque de verre et un poids de 0,2-0,4 kg.
4. Fixer l'ARN à la membrane de nylon en chauffant à 80°C dans une étuve pendant deux heures ou en plaçant la membrane, le côté où se trouve l'ARN en-dessous, sur un transilluminateur émettant une longueur d'onde courte (254 nm ou 302 nm) pendant 5 min. On peut se servir de la transillumination dans l'UV pour observer l'ARN fixé à la membrane et juger de l'efficacité de transfert ou pour prendre une photo; aucune coloration n'est requise. Après le séjour dans l'étuve, le filtre peut être conservé à la température ambiante pendant des semaines, auquel cas il doit être passé à nouveau à l'étuve avant une préhybridation.

Hybridation et autoradiographie

1. Préhybrider (1-4 h) et hybrider (12-36 h) l'ARN selon les méthodes fournies par le fabricant de la membrane.
2. Laver les membranes dans des conditions modérées : deux lavages de 20 min dans un SSC 1X renfermant 0,1 % (p/v) de SDS à la température ambiante, suivis de deux lavages de 20 min à 50-55°C dans un SSC 0,1X renfermant 0,1 % de SDS.
3. Autoradiographier à -70°C en utilisant un film Kodak XAR.

4.5 Fractionnement de l'ARNm selon la taille

Séparation en gradient de sucrose (voir Casey et collab., 1985) :

1. Incuber l'ARN poly (A)$^+$ (70-100 µg) dans 100 µL d'une solution renfermant du DMSO à 10 % (v/v), 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de LiCl et 1 mM d'EDTA à 65°C pendant 5 min.
2. Refroidir rapidement sur glace et déposer sur 10 mL d'un gradient linéaire de sucrose à 5-20 % (p/v) dissous dans 95 % (v/v) de DMSO, 4 % (v/v) de formamide, 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de LiCl et 1 mM d'EDTA.
3. Centrifuger à 15 000 tr/min à 25°C pendant 48 h.
4. Récupérer l'ARN de fractions de 200 µL prélevées dans le tube renfermant le gradient de sucrose en précipitant à l'éthanol à -20°C après avoir ajouté 0,15 M d'acétate de sodium (pH 4,8) et 3 µg d'ARNt de foie de veau par fraction.
5. Laver le précipité d'ARN avec de l'éthanol à 80 %, sécher et dissoudre dans l'eau (10 µL par fraction).

Casey et collab. (1985) ont utilisé 0,5 mL d'ARN redissous à partir de chaque fraction de gradient dans leurs études de traduction *in vitro* pour déterminer dans quelles fractions est situé l'ARNm codant pour certaines protéines de graines.

5. Préparation et caractérisation de l'ADNc

5.1 Méthodes de préparation de l'ADNc

Kimmel et Berger (1987) ont décrit plusieurs approches pour préparer de l'ADNc à partir d'ARNm. Les éléments de base pour la synthèse du premier brin sont : l'ARNm, une amorce complémentaire, la transcriptase inverse et des désoxyribonucléosides triphosphates. L'amorce peut être un oligo (dT), des hexamères de séquence aléatoire ou des aligomères spécifiques. On utilise habituellement un oligo (dT) pour le clonage, car il se lie à l'extrémité polyadénylée 3' de l'ARNm et il offre de meilleures chances d'obtenir des clones de longueur maximale. L'utilisation d'hexamères de séquence aléatoire permet à la séquence d'ARNm d'être représentée de façon équilibrée, mais ne donne pas des ADNc de longueur maximale. Les oligomères spécifiques se lient à certaines séquences seulement et la transcription n'a lieu que pour un seul ou un petit groupe d'ARNm. Cette méthode d'extension de l'amorce donne lieu à une fragmentation.

Pour la synthèse du second brin, on peut couper l'ARN dans les hybrides ARN-ADN au moyen de la RNase H d'*E. coli* et uiliser les fragments obtenus pour fabriquer des brins d'ADNc en présence de la DNA polymérase I. Dans la méthode classique, il se produit un repliement en épingle à cheveux à l'extrémité 3' du premier brin nouvellement synthétisé qui sert d'amorce pour fabriquer le deuxième brin en présence de dNTP, du fragment de Kenow et de la transcriptase inverse. La boucle en épingle à cheveux est coupée à l'aide d'une nucléase spécifique au simple brin, comme la nucléase du haricot mungo ou la nucléase S1.

Pour cloner l'insert final d'ADNc dans un ADN de plasmide ou de bactériophage, on traite l'ADNc pour obtenir des extrémités cohésives et on l'hybride à un plasmide présentant des séquences homopolymériques complémentaires. On peut également fixer des «linkers» ou des adaptateurs aux extrémités franches de l'ADNc. L'ADNc produit par la méthode de l'hybride ARN-ADN peut être incubé avec une transférase terminale et du dGTP, puis fixé aux extrémités du plasmide. Cette méthode est simple et efficace pour préparer des banques d'ADNc donnant jusqu'à 50 000 clones. Le vecteur pBR322 utilisé à l'origine à été remplacé par de nouveaux vecteurs comme les plasmides pUC. Si l'on utilise la méthode classique pour fabriquer de l'ADNc, la liaison à un plasmide n'est pas recommandée à cause des problèmes suscités par la nucléase du haricot mungo ou la nucléase S1. Ces nucléases peuvent éliminer des séquences non appariées au niveau de la boucle en épingle à cheveux et produisent des coupures dans l'ADNc qui sont la cause de problèmes au cours du clonage, la transférase terminal produisant, dans ce cas, des structures ramifiées.

Des «linkers» et des adaptateurs peuvent également être utilisés pour fixer l'ADNc au vecteur. Il est préférable d'utiliser des concentrations élevées de linkers car cela favorise la réaction de ligation de l'ADNc et inhibe également l'auto-ligation des inserts. Cette méthode exige que l'ADNc soit d'abord méthylé pour empêcher qu'il soit coupé par l'endonucléase de restriction utilisée pour créer les extrémités cohésives de l'ADNc nécessaires pour la ligation au vecteur (par exemple lambda gt10, lambda gt11). Pour un clonage directionnel, on peut utiliser l'ADNc produit par la méthode classique, même si cet ADNc n'a pas la longueur maximale. Dans cette méthode, un type de linker est attaché à l'extrémité franche de l'ADNc, la boucle en épingle à cheveux est coupée, et le second type de linker est fixé aux deux extrémités de l'ADNc double brin final. On utilise alors deux types différents d'endonucléase de restriction pour couper les deux types de linkers à chaque extrémité. Promega a introduit une nouvelle méthode de clonage directionnel. Elle fait appel à une séquence amorce-adaptateur *Xba*I [5'GTCGACTCTAGA$(dT)_{15}$3'] qui s'hybride à la queue de poly (A) de l'ARNm. Après la synthèse du premier et du second brin d'ADNc (en utilisant la RNase pour produire des coupures dans l'hybride ARN-ADN), on ajoute des linkers *Eco*RI aux deux extrémités de l'insert d'ADNc. Après la digestion *Eco*RI et *Xba*I, les inserts peuvent être clonés de façon directionnelle dans un vecteur lambda présentant des sites de clonages *Eco*RI et *Xba*I uniques. Nous utilisons maintenant

cette méthode pour créer des banques par soustraction dans le but d'isoler des gènes spécifiques à un stade ou à un tissu au cours de la germination des semences de pin gris. La section 7 traite plus en détails de certaines de ces méthodes.

Dans le criblage avec des sondes d'acides nucléiques et la création de banques importantes d'ADNc, des vecteurs comme le lambda gt10 ou le lambda ZAP peuvent être utilisés. Il faut préparer l'ADNc en utilisant la RNase pour produire des coupures dans l'hybride ARN-ADN, et utiliser des linkers pour insérer l'ADNc dans un vecteur convenable. La production d'une banque de plus de 10^6 clones peut exiger 10-40 µg d'ARNm. Dans le cas des ARNm moins abondants, Maniatis et collab. (1982) ont donné des exemples du nombre de clones nécessaires pour s'assurer que ces ARNm soient présents.

La synthèse d'ADNc à l'aide des vecteurs présente certains avantages même si la méthode peut présenter plus de difficultés et soit plus laborieuse que les procédés classiques de clonage de l'ADNc (voir Okayama et Berg, 1982). On peut, par exemple, produire un nombre relativement restreint de clones ne renfermant pas d'inserts, obtenir un rendement élevé de clones d'ADNc à partir de petites quantités d'ARNm et préparer de longs ADNc présentant une proportion élevée de clones de longueur maximale. Il y a cependant certains inconvénients : même s'il y a davantage de molécules de longueur maximale, la production totale de clones est réduite, et comme cette méthode nécessite une quantité trois fois plus élevée de molécules d'ARNm que de molécules d'amorce de vecteur, elle est très inefficace. Deininger (1987) a décrit des méthodes de synthèse d'ADNc à partir des vecteurs, comme le pUC18 ou le pARC. Il existe divers procédés et divers vecteurs pour ce type de clonage de l'ADNc. Par exemple, le vecteur pARC7 dimérisé permet d'éliminer certaines étapes de la méthode originale d'Okayama et Berg (1982) et donne deux molécules de vecteur fixées à deux molécules distinctes d'ADNc. On utilise habituellement des vecteurs spécialisés présentant plusieurs sites de clonage, comme ceux qui peuvent donner de grandes quantités d'ARN à partir d'ADNc *in vitro* avec des ARN polymérases spécifiques (par exemple SP6). On peut les utiliser dans des réactions de traduction *in vitro* suivies d'une caractérisation immunologique.

5.2 Facteurs influençant la synthèse du premier brin d'ADNc

Pour la synthèse du premier brin, un tampon à pH 8,3 (Tris est le meilleur) est optimal pour une incorporation efficace et une production de transcripts de longueur maximale (voir Maniatis et collab., 1982). On estime qu'une déviation de ±0,5 unités de pH produit cinq fois moins de transcripts de longueur maximale. Dans le cas de la transcriptase inverse de l'AMV, le pH doit être ajusté à 42°C. La concentration optimale de l'ion potassium relativement à la synthèse totale et à la longueur de l'ADNc est 140-150 mM. La présence d'ions sodium produit des transcripts plus courts. Il faut absolument des cations divalents; ainsi, la concentration optimale de Mg^{++} est d'environ 6-10 mM.

Il est important d'ajouter de fortes concentrations des quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) pour obtenir des rendements élevés en transcripts de longueur maximale. On utilise habituellement des concentrations de l'ordre de 200 à 250 µM. Il faut préparer des solutions concentrées (>40 mM) de chaque dNTP et les diluer pour obtenir des solutions mères de 10 mM. Les solutions diluées ne doivent pas être conservées. On doit faire un mélange de chacun et stériliser par filtration. Les coefficients d'extinction molaire des bases et les longueurs d'onde, donnant l'absorption maximale, sont les suivants pour un trajet de 1 cm : 1,54 x 10^4 (259 nm) pour l'adénine; 9,1 x 10^3 (271 nm) pour le cytosine; 1,37 x 10^4 (253 nm) pour la guanine; 1,0 x 10^4 (262 nm) pour l'uracile et 7,4 x 10^3 (260 nm) pour la thymine.

On prépare une solution concentrée (par exemple 100 µg/mL) de l'amorce oligo 12-18 (dT) dans un pyrocarbonate de diéthyle à 0,1 %, on brasse à la température ambiante et on chauffe à 70°C pendant 1 h. On prépare une solution de pyrophosphate de sodium 80 mM comme celle des oligo (dT). Le pyrophosphate et l'actinomycine D inhibent la synthèse du second brin et, avec l'enzyme de l'AMV, le pyrophosphate augmente la production d'ADNc de longueur maximale.

Il ne faut pas utiliser le pyrophosphate avec l'enzyme du virus de la leucémie murine Moloney (MMLV) (Krug et Berger, 1987), mais plutôt l'actinomycine D. On ajoute de la spermidine dans certains procédés faisant appel à l'enzyme de l'AMV, car elle est censée augmenter la production de l'ADNc de longueur maximale. On ajoute un inhibiteur de la ribonucléase, comme la RNasine, dans le milieu de réaction, car cela peut parfois augmenter la production d'ADNc.

Avant d'utiliser de l'ARN poly $(A)^+$, il faut le chauffer à 70°C pendant 3 à 5 min., puis le refroidir immédiatement. On utilise parfois de l'hydroxyde de méthylmercure pour empêcher la formation d'une structure secondaire trop importante dans l'ARN, même si cela s'accompagne d'une diminution du rendement en ADNc.

La transcriptase inverse présente *in vitro* une activité polymérase et une activité ribonucléase H (RNase H) qui lui est associée. Pour produire un brin d'ADN complémentaire à l'ARN, la polymérase a besoin d'une matrice formée d'une molécule d'ARN hybridée à une amorce d'ADN avec un groupement 3'-hydroxyle et quatre désoxyribonucléosides triphosphates. Dans ce processus toutefois, on doit contrer l'effet de la RNase H, une exonucléase qui dégrade l'ARN en hybrides ADN-ARN (Krug et Berger, 1987). Diverses substances chimiques, par exemple le pyrophosphate, l'ion fluo-

rure, la RNasine, ont été utilisées pour inhiber l'activité ribonucléase de la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (AMV), mais sans grand succès. Toutefois, certaines préparations de transcriptase inverse peuvent présenter un ratio différent des deux activités. À part la transcriptase inverse de l'AMV, on peut également se procurer une transcriptase inverse MMLV clonée. Des concentrations élevées de transcriptase inverse (dNTP) favorisent la synthèse d'ADNc de longueur maximale. Maniatis et collab. (1982) ont indiqué qu'un rendement élevé et qu'une augmentation de la taille des transcripts d'ADNc peuvent exiger jusqu'à 80 unités d'enzyme par mg de matrice. La transcriptase inverse doit être conservée en petits volumes à -70°C.

5.3 Réaction de synthèse du premier brin d'ADNc

Solutions mères

Tampon 5X pour transcriptase inverse de l'AMV :
Tris-HCl (pH 8,3) 250 mM
KCl 750 mM
$MgCl_2$ 50 mM
dithiothréitol 5 mM
EDTA 5 mM
albumine de sérum bovin, 50 µg/mL

pyrophosphate de sodium	80 mM
inhibiteur de la ribonucléase du placenta humain,	20 unités/µL
mélange de désoxyribonucléosides triphosphates	10 mM de dATP, de dGTP et de dTT et 5 mM de dCTP
amorce d'oligo dT (12-18)	2 µg/µL
ou	
amorce d'hexanucléotides de séquence aléatoire	150 ng/µL
ou	
amorce-adaptateur (*Xba*, *Eco*RI) (Promega)	1 µg/µL
transcriptase inverse	20 unités/µL

La concentration et le type d'ingrédients dans le mélange de réaction peuvent varier selon le fabricant (par exempled Amersham, BRL, NEM). À l'heure actuelle, nous utilisons certains élements du kit d'Amersham. Invitrogen a introduit récemment un kit pour la synthèse d'ADNc et la création de banques d'ADNc qui est censé présenter certains avantages par rapport aux autres. Des phagemides sont utilisés comme vecteurs.

Le mélange de réaction suivant peut être utilisé pour 1 ou 5 µg d'ARNm poly $(A)^+$. Les enzymes doivent être gardés à -20°C jusqu'au moment de les utiliser et les autres ingrédients doivent être gardés sur glace une fois dégelés après avoir été conservés à -20°C. La réaction doit être exécutée sur glace dans un microtube à centrifuger stérile de 1,5 mL. Ajouter les ingrédients suivants dans l'ordre :

1 µg	ou	5 µg	
4 µL		10 µL	tampon de réaction 5X pour la synthèse du premier brin
1 µL		2,5 µL	solution de pyrophosphate de sodium
1 µL		2,5 µL	inhibiteur de la ribonucléase du placenta humain
2 µL		5 µL	mélange de désoxyribonucléosides triphosphates
1 µL		2,5 µL	amorce d'oligo $(dT)_{12-18}$ (ou 0,5 µg d'amorce-adaptateur par µg d'ARN ou 2 ou 5 µL d'amorce d'hexanucléotides de séquence aléatoire)
X µL		X µL	5 µCi de [α-^{32}P]-dCTP (facultatif)
Y µL		Y µL	ARNm (peut être chauffé à 60°C pendant quelques minutes avant la réaction)
Z µL		Z µL	H_2O

Dans une volume de 20 µL pour 1 µg d'ARNm ou de 50 µL pour 5 µg d'ARNm.

- Mélanger doucement et centrifuger quelques secondes dans une microcentrifugeuse
- Ajouter 20 unités de transcriptase inverse par µg d'ARNm
- Incuber à 42°C pendant 1-2 h, puis mettre sur glace
- Prélever un échantillon pour déterminer l'efficacité du marquage (section 5.5).

5.4 Synthèse du second brin d'ADNc

Après la synthèse du premier brin, l'hybride ARN-ADN est laissé intact. L'ARN est coupé avec la RNase H, ce qui laisse uniquement des amorces d'ARN de petite taille avec des groupements 3'-OH libres fixés à l'ADNc. Ces groupements 3'-OH sont alors utilisés par l'ADN polymérase I pour synthétiser un deuxième brin le long du premier. Avant le clonage au niveau des sites *Eco*RI de l'ADN lambda, on utilise l'ADN polymérase de T4 pour créer des extrémités franches permettant de bien fixer les linkers aux inserts d'ADNc. Même si l'on utilise de l'actinomycine D ou du pyrophosphate de sodium et une matrice à concentration élevée d'ARNm au cours de la synthèse du premier brin pour supprimer la synthèse du second brin par la transcriptase inverse, il peut rester des boucles au niveau des extrémités 3' du premier brin. L'ADN polymérase I peut utiliser ces boucles comme amorces pour la synthèse du second brin et produire des ADNc ne pouvant pas être clonés. Gubler (1987) a décrit des méthodes pour déterminer la présence et le nombre de telle boucles. Par exemple, les boucles en épingles à cheveux peuvent être coupées par la nucléase du haricot mungo ou la nucléase S_1.

Solutions mères :

Tampon de réaction 2X
Tris-HCl (pH 7,5) 40 mM
$MgCl_2$ 10 mM
$(NH_4)_2SO_4$ 20 mM
KCl 200 mM
albumine de sérum bovin 100 µg/mL
ribonucléase H d'*E. coli* 0,8 unités/µL
ADN polymérase I d'*E. coli* 6 unités/µL
ADN polymérase de T4 4,5 unités/µL

Milieu de réaction pour la synthèse du second brin.

Au mélange pour la synthèse du premier brin d'ADNc sur glace, ajouter les ingrédients suivants dans l'ordre :

1 µg ou d'ARNm original	5 µg d'ARNm original	
37,5 µL	93,5 µL	tampon de réaction pour la synthèse du second brin
A µL	A µL	50 µCi [α-^{32}P]dCTP (facultatif)
0,8 unités	4,0 unités	ribonucléase H d'*E. coli*
23 unités	115 unités	ADN polymérase I d'*E. coli*
B µL	B µL	H_2O

Dans un volume final (incluant l'enzyme) de 100 µL pour l'échantillon de 1 µg d'ARNm et de 250 µL pour l'échantillon de 5 µg d'ARNm.

- Mélanger doucement et incuber à 12°C pendant 60 min, puis à 22°C pendant 60 min.
- Incuber à 70°C pendant 10 min.
- Centrifuger quelques sec. dans une microcentrifugeuse.
- Mettre sur glace et ajouter 2 unités d'ADN polymérase de T4 par microgramme d'ARNm original.
- Mélanger doucement et incuber à 37°C pendant 10 min.
- Arrêter la réaction en ajoutant 4 µL d'EDTA 0,25 M (pH 8,0) par 100 µL de mélange de réaction final
- Prélever un échantillon pour vérifier l'incorporation de l'isotope.

5.5 Calcul du pourcentage d'incorporation

Pour déterminer le taux de synthèse d'ADNc, il faut mesurer la quantité de radioactivité sur les filtres secs, laver les filtres pour éliminer le substrat marqué non incorporé et compter la radioactivité sur les filtres à nouveau. On peut compter le ^{32}P sur les filtres de trois façons. L'appareil Bioscan (modèle QC2000) est sensibles aux particules β et mesure le ^{32}P avec une efficacité de comptage d'environ 30 %. Le compteur Bioscan mesure les particules chargées et non les rayons Cerenkoff. Ces rayons frappent les parois de verre ou de plastique d'un flacon à scintillation lorsqu'un filtre sec est placé à plat au fond du flacon. On peut également déterminer la radioactivité en se servant du canal de ^{3}H d'un compteur à scintillation, auquel cas on obtient une efficacité de comptage d'environ 25 % avec le ^{32}P. Dans la troisième méthode, on utilise un liquide à scintillation et on compte à l'aide du canal de ^{32}P; on peut ainsi obtenir une efficacité de comptage de presque 100 %. Nous utilisons habituellement le Bioscan, qui est un appareil peu coûteux et peu encombrant sur les tables de laboratoire.

1. Ajouter 5 µCi de [α-^{32}P]dCTP au mélange de réaction pour la synthèse du premier brin (20 µL).
2. Après la synthèse du premier brin d'ADNc, prélever un échantillon de 1 µL et procéder aux opérations suivantes.
3. Dans le mélange de réaction pour la synthèse du second brin, utiliser 50 µCi de [α-^{32}P]dCTP. Après la réaction, prélever 1 µL et procéder aux opérations suivantes.
4. Transférer une aliquote de 1-2 µL du mélange de réaction ci-dessus dans un tube renfermant 20 µL d'eau ou de l'EDTA 0,2 M et bien mélanger.
5. Déposer 5 µL au centre de deux disques de papier filtre Whatman DE81 de 2,4 cm. Marquer A et B les filtres qui renferment le mélange de synthèse du premier brin, C et D ceux qui renferment le mélange de synthèse du second brin.
6. Soumettre les filtres B et D à six lavages de 5 min dans un Na_2HPO_4 0,5 M, à deux lavages de 1 min dans l'eau, puis à deux lavages de 1 min dans l'éthanol à 95 %. Les filtres B et D servent à mesurer le nombre de CPM incorporés dans l'ADNc.
7. Sécher les deux filtres (par exemple au moyen d'une lampe infrarouge) et compter.

On calcule le pourcentage d'incorporation au cours de la synthèse du premier brin de la façon suivante :

$$\frac{\text{CPM sur le filtre B}}{\text{CPM sur le filtre A}} \quad X\ 100\ [\%]$$

Pour calculer le pourcentage d'incorporation au cours de la synthèse du second brin, il faut d'abord soustraire la quantité de radioactivité incorporée dans le premier brin. On divise d'abord les valeurs A et B par 6, étant donné que le mélange de réaction pour le premier brin équivaut à 1/6 du volume du mélange de réaction pour le second brin. Par conséquent, le pourcentage d'incorporation au cours de la synthèse du deuxième brin est :

$$\frac{D-B/6}{C-A/6} \quad X\ 100\ [\%].$$

Pour calculer la quantité d'ADNc synthétisée dans les mélanges de réaction de 20 µL pour la synthèse du premier brin et de 100 µL pour la synthèse du deuxième brin, on utilise la formule suivant :

(% d'incorporation X 140) ng.

Pour calculer le pourcentage d'ARNm transcrit, on utilise la formule :

$$\frac{\text{Quantité de premier brin d'ADNc synthétisée}}{\text{Quantité d'ARNm au départ}} \times 100\ [\%].$$

Pour calculer le rendement de la synthèse du second brin, on utilise la formule :

$$\frac{\text{Quantité de second brin d'ADNc}}{\text{Quantité de premier brin d'ADNc}} \times 100\ [\%].$$

5.6 Purification de l'ADNc

1. Ajouter 250 µL (ou un volume égal) de phénol-chloroforme (saturé de TE)
2. Passer au vortex et centrifuger pendant 1 min.
3. Prélever la phase aqueuse (phase supérieure) et répéter l'extraction au phénol-chloroforme
4. Ajouter deux volumes de chloroforme à la phase aqueuse et bien mélanger.
5. Centrifuger brièvement et conserver la phase supérieure.

Élimination des nucléotides non incorporés

On peut les élminer par chromatographie sur Sephadex G50 ou par précipitation à l'éthanol en présence de l'acétate d'ammonium.

A. Précipitation à l'éthanol en présence de l'acétate d'ammonium

À l'ADNc extrait au phénol, ajouter :

1. Un volume égal d'acétate d'ammonium 4 M.
2. Le double du volume combiné d'éthanol froid (-20°C).
3. Refroidir pendant 15 min sur glace sèche ou dans un congélateur approprié (-70°C).
4. Réchauffer à la température ambiante en agitant doucement.
5. Centrifuger pendant 10 min.
6. Aspirer le surnageant en prenant garde de ne pas remuer le culot.
7. Laver le culot une fois avec 50 µL d'acétate d'ammonium 2 M, 100 µL d'éthanol (-20°C) à la température ambiante, agiter doucement, centrifuger et aspirer la phase supérieure.
8. Ajouter au culot 200 µL d'éthanol froid (-20°C) en prenant garde de ne pas remuer le culot.
9. Centrifuger pendant 2 min.
10. Aspirer soigneusement le surnageant.
11. Sécher le culot dans un dessiccateur sous vide, de 2 à 3 min au maximum.
12. Remettre en suspension dans un volume approprié de TE.
13. Stocker à -20°C.

B. Chromatographie sur Sephadex G50

Lorsque l'ADNc est synthétisé à partir de 5 µg d'ARNm, il faut séparer le matériel en deux et faire deux chromatographies sur deux colonnes de Sephadex G50. À la sortie des colonnes, les deux échantillons d'ADNc sont réunis avant d'être précipités à l'éthanol.

1. Bourrer le fond d'une seringue jetable de 1 mL avec une petite quantité de laine de verre stérile. Dans la seringue, préparer une colonne de Séphadex G50 (volume de 0,9 mL) équilibrée dans un tampon.
2. Placer la seringue dans un tube et centrifuger à 1600 tr/min pendant 4 min. Continuer d'ajouter du Sephadex jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,9 mL.
3. Ajouter 0,1 mL de TE, 0,1 M de NaCl et recentrifuger comme ci-dessus.
4. Répéter l'étape 3 jusqu'à ce que le volume élué soit égal à environ 0,1 mL. Transférer la seringue dans un autre tube à centrifuger.
5. Déposer l'ADNc sur la colonne dans un vol. total de 0,1 mL (utiliser le tampon pour Sephadex G50 pour compléter le volume).
6. Centrifuger comme à l'étape 2 et recueillir le 0,1 mL d'éluat sorti de la seringue. Les nucléotides non incorporés restent dans la seringue et doivent être éliminés de façon appropriée (matériel radioactif).
7. Ajouter à l'ADNc 0,1 vol. d'acétate de Na 3 M et 2 vol. d'éthanol (-20°C). Mettre dans un bain d'éthanol et de glace sèche pendant 20 min. Centrifuger pendant 15 min.
8. Aspirer le surnageant en prenant garde de ne pas remuer le culot d'ADN.
10. Centrifuger pendant 2 min dans une microcentrifugeuse.
11. Aspirer soigneusement le surnageant.
12. Sécher le culot dans un dessiccateur sous vide pendant 2-3 min.
13. Remettre l'ADNc en suspension dans un tampon TE et stocker à -20°C.

Remarque : On peut se procurer des colonnes de Sephadex G-50 préparées (colonnes «Nick») de Pharmacia.

Électrophorèse de l'ADNc sur gel

Préparation de l'échantillon

1. Prélever un échantillon du mélange de réaction pour la synthèse de l'ADNc représentant entre 10 000 et 30 000 CPM de radioactivité. Mettre dans un tube à centrifuger et procéder aux opérations nécessaires pour éliminer toute trace d'ARN.
2. Ajouter 20 µL de solution d'ADN vecteur (100 µg/mL d'ADN de sperme de saumon dans 20 mM d'EDTA).

3. Ajouter un volume de NaOH 1 M équivalent à 1/3 du volume combiné.
4. Incuber à 46°C pendant 30 min.
5. Centrifuger pendant quelques sec. dans une microcentrifugeuse et ajouter un volume de HCl 1 M égal au volume de NaOH ajouté à l'étape 3.
6. Ajouter un volume de Tris 1 M (pH 8,0) égal au volume de HCl 1 M ajouté à l'étape 5.
7. Le mélange obtenu doit être purifié par extractions au phénol-chloroforme suivies de précipitations à l'éthanol comme il a été décrit plus haut pour la purification de l'ADNc.
8. Remettre le culot en suspension dans un volume approprié de tampon alcalin pour dépôt de l'échantillon sur gel d'agarose :

   NaOH 50 mM
   EDTA 1 mM
   2,5 % de Ficoll (Type 400, Pharmacia)
   0,025 % de vert de bromocrésol (ou de bleu de bromophénol fraîchement préparé).

Électrophorèse

1. Ajouter de l'agarose à 50 mM de NaCl et 1 mM d'EDTA de façon à obtenir une concentration de gel de 1,4 % (préparer une solution tampon mère 10X).
2. Chauffer dans un four à micro-onde jusqu'à la dissolution de l'agarose.
3. Refroidir la solution à 50°C et verser dans le réservoir de gel.
4. Ajouter du tampon pour électrophorèse en milieu alcalin pour recouvrir le gel jusqu'à une hauteur de 3-5 mm : Une solution mère 10X renferme 300 mM de NaOH et 10 mM d'EDTA.
5. Laisser le gel gonfler dans le tampon pendant au moins 30 min avant de déposer l'ADN. Pendant l'électrophorèse, le gel doit être recouvert de 1 mm de tampon.
6. Déposer l'échantillon d'ADNc et procéder à l'électrophorèse à des voltages au maximum de 7,5 v/cm jusqu'à ce que le colorant ait migré à environ 1/3 de la longueur du gel. Étant donné que le vert de bromocrésol peut diffuser dans le gel après avoir migré hors de la zone de chargement, il faut couper le courant et placer une plaque de verre sur le gel avant de poursuivre l'électrophorèse.
7. Retirer le gel et faire tremper pendant 30 min dans une solution d'acide trichloroacétique à 7 % à la température ambiante, en changeant deux fois la solution.
8. Monter le gel sur une lame de verre et laisser sécher pendant plusieurs heures sous plusieurs épaisseurs de papier Whatman 3MM recouvertes d'une autre plaque de verre. Le gel sec est recouvert d'une pellicule plastique avant d'être soumis à l'autoradiographie à -70°C.

5.7 Fractionnement de l'ADNc en fonction de la taille

5.7.1 Chromatographie de l'ADNc sur Sepharose CL-4B

La méthode suivante est essentiellement celle décrit par Eschenfeldt et Berger (1987).

1. Remplir une colonne de 20 X 1 cm (diamètre) (par exemple colonne Econo de Bio-Rad) avec une pâte de Sepharose CL-4B dans l'eau jusqu'à une hauteur de 19 cm. La colonne est utilisée et conservée à la température ambiante.
2. Laver à l'eau, puis à plusieurs colonnes d'eau saturée de pyrocarbonate de diéthyle à 0,05 %.
3. Laver à l'eau pour éliminer le pyrocarbonate de diéthyle et équilibrer la colonne avec 50 mM de NH_4HCO_3 (pH 8).
4. Étalonner la colonne avec 100 µL d'une solution à 20 µg/mL d'ADN de PhiX174 digéré à la *Hae*III. Après avoir chargé la colonne, recueillir des fractions de 0,20 à 0,25 mL (7 gouttes) dans un collecteur de fractions à une pression de 30 à 35 m. Transférer les fractions dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et réduire à sec. Analyser chaque fraction complète sur gel d'agarose à 2 %. L'ADNc de 600 pb et plus se retrouve dans le volume mort de la colonne, alors que les molécules plus petites apparaissent après qu'environ 5,5 mL ont été recueillis.
5. Dissoudre l'échantillon d'ADNc dans 100 µL d'eau. Il n'est habituellement pas nécessaire d'utiliser un marqueur si l'étalonnage a été bien fait. Déposer l'échantillon sur la colonne et activer le collecteur de fractions. Lorsque l'échantillon a pénétré dans le gel, laver avec 100 µL de tampon, brancher le réservoir de NH_4HCO_3 et recueillir les fractions comme ci-dessus.
6. Réunir les fractions d'ADNc de poids moléculaire élevé correspondant au front ascendant, et 2 à 3 fractions correspondant au front descendant.
7. Réduire à sec les fractions réunies, réhydrater avec 0,5 mL d'eau et sécher à nouveau. Dissoudre dans 20 µL d'eau, ajouter au besoin 5 µg de poly $(A)^+$ comme vecteur et précipiter à l'éthanol en présence d'acétate de potassium (3 M, pH 5,5). On peut précipiter l'échantillon une deuxième fois pour éliminer le NH_4HCO_3 résiduel (la terminale transférase et la polynucléotide kinase de T4 sont très sensibles aux ions ammonium).

   Les colonnes de Sepharose CL-4B peuvent être régénérées et réutilisées pendant des années.

Comme l'ont décrit Maniatis et collab. (1982), il faut d'abord dissoudre l'ADNc dans 10 µL d'eau et ajouter ensuite 10 µL de Tris-HCl 20 mM (pH 8), 0,6 M de NaCl et 2 mM d'EDTA. L'ADNc est fractionné en diverses

classes selon la taille par chromatographie sur une colonne de 1 mL de Sepharose CL-4B équilibrée dans le même tampon. On recueille des fractions de 50 µL et on dose une aliquote de chacune des fractions par électrophorèse sur gel d'agarose (1,4 %) en milieu alcalin en utilisant un ensemble de fragments d'ADN pBR322 marqués à leur extrémité comme marqueurs de PM. On localise par autoradiographie l'endroit où a migré l'ADNc et on recueille les fractions d'ADNc de plus de 500 pb pour les précipiter à l'éthanol.

5.7.2 Utilisation de l'agarose à bas point de fusion

1. Faire un gel d'agarose (0,7-1,5 %) à l'aide de tampon TBE et renfermant du bromure d'éthidium (0,5 µg/mL).
2. Dissoudre l'agarose, refroidir à 50°C et verser dans le réservoir à gel renfermant du tampon TBE et du bromure d'éthidium.
3. Charger le gel avec les échantillons d'ADNc et les marqueurs de PM, par exemple lambda/*Hind*III.
4. Soumettre à l'électrophorèse à 4°C en utilisant un courant de 25 à 30 mA.
5. Couper les fractions d'ADNc appropriées et les mettre dans des microtubes à centrifuger. Ajouter 3 à 5 vol. de Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), 1 mM d'EDTA et conserver à 65°C pendant 10 min.
6. Ajouter un volume égal de phénol, passer au vortex et centrifuger pendant 10 min.
7. Recueillir et conserver la phase aqueuse (phase supérieure) dans un autre tube.
8. Ajouter à la phase phénolique (phase inférieure) 0,5 vol. de Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) et 1 mM d'EDTA. Passer au vortex et centrifuger pendant 10 min.
9. Recueillir la phase aqueuse (phase supérieure) et l'ajouter à la phase aqueuse conservée à l'étape 7.
10. Répéter les étapes 6 à 9.
11. Ajouter à la phase aqueuse finale un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Passer au vortex et centrifuger pendant 2 min.
12. Recueillir la phase aqueuse supérieure dans un tube propre et ajouter 0,1 vol d'acétate de sodium 3 M, puis 2 vol. d'éthanol (-20°C). Conserver à -70°C pendant 20 min et centrifuger pendant 15 min.
13. Ajouter au culot 200 µL d'éthanol (à -20°C) et centrifuger pendant 2 min.
14. Éliminer le surnageant et sécher le culot dans un dessiccateur sous vide pendant 2 à 3 min. Remettre le culot en suspension dans un tampon TE et conserver à -20°C.

5.7.3 Séparation de l'ADNc sur gel de polyacrylamide

Davis et collab. (1986) ont décrit une méthode pour éliminer les linkers *Eco*RI en excès et les petits fragments d'ADNc. L'ADNc est fractionné selon la taille sur gel de polyacrylamide à 5 % dans un tampon TBE. L'échantillon est séparé en parallèle avec des marqueurs de taille comprenant du pBR322 digéré à la *Hinf*I et à l'*Eco*RI et marqué aux extrémités par le fragment de grande taille de l'ADN polymérase I et le ^{32}P-dATP, de la façon suivante :

1-2 µg d'ADN pBR3221	10 µL
tampon *Eco*RI 10 X	2 µL
α-^{32}P-dATP	4 µL
*Hinf*I (10 U/µL)	1 µL
*Eco*RI (10 U/µL)	1 µL
H_2O	2 µL

Incuber à 37°C pendant 60 min. Ajouter 1 µL d'ADN polymérase I (fragment de grande taille, 5 U/µL) et incuber à 37°C pendant 15 min. Chauffer l'échantillon à 65°C pendant 10 min et éliminer le ^{32}P-dATP non incorporé par purification du digesté sur Elutip. Les marqueurs de PM ont 993, 631, 517, 506, 396, 344, 298, 221, 220, 154 et 75 pb. Après une électrophorèse de 2 à 3 heures à environ 10 V/cm, tout l'ADNc migrant à plus de 500 pb est excisé et recueilli par électroélution. L'échantillon est déposé dans un sac à dialyse avec 1 mL de tampon TBE 1X et 10 µg d'ARNt de levure par mL, le sac à dialyse est fermé aux deux extrémités et le contenu est élué pendant 12 à 16 h. L'ADNc peut être concentré par passage sur des minicolonnes Elutip-d (Schleicher et Schuell, Inc.). L'ADNc est alors précipité à l'éthanol.

5.7.4 Séparation de l'ADNc sur gradients de sucrose

Voici une brève description de la méthode de Bartels et Thompson (1983).

1. Fractionner en fonction de la taille sur 4,5 mL d'un gradient de sucrose de 5-20 % préparé dans :

   Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)
   EDTA 1 mM
   NaCl 10 mM
   Centrifuger à 50 000 tr/min pendant 4 h à la température ambiante en utilisant un rotor SW 65 (Beckman).

2. Recueillir 20 fractions
3. Analyser une petite portion de chaque fraction sur un gel de 5 % polyacrylamide-urée pour évaluer la taille de l'ADNc en présence de 10 mM d'acétate de Mg.
4. Précipiter à l'éthanol en présence de 10 mM d'acétate de Mg les fractions d'ADNc renfermant de l'ADNc comprenant plus de 500 nucléotides environ.

6. Clonage de l'ADNc

6.1 Clonage de l'ADNc au moyen du bactériophage lambda

6.1.1 Préparation d'ADNc à linker *Eco*RI

Il existe divers procédés et kits pour cloner des molécules d'ADNc. À l'heure actuelle, nous utilisons une partie du kit d'Amersham pour obtenir de l'ADNc avec linker *Eco*RI, puis nous effectuons une ligation au lambda ZAP (Stratagene) et une encapsidation *in vitro* (Stratagene). Lorsqu'on utilise des linkers, il faut soumettre l'insert à une méthylation séquentielle, procéder à une ligation des linkers phorphorylés à l'ADNc, à une digestion *Eco*RI de l'ADNc lié et à une élimination des molécules de linkers en excès, par exemple par chromatographie sur colonne de Sepharose CL-4B, comme il a déjà été mentionné, ou en utilisant des colonnes préparées comme celles d'Amersham.

Méthylation de l'ADNc

Les sites internes *Eco*RI de l'ADNc sont protégés d'abord par méthylation au moyen de l'*Eco*RI méthylase. En utilisant un tube Eppendorf de 1,5 mL, méthyler entre 0,5 et 1 µg d'ADN dans 20 µL de tampon pour l'ADN méthylase avec 20 unités d'*Eco*RI méthylase. Le tampon de l'ADN méthylase est le suivant :

Tris-HCl 50 mM (pH 8,0)
NaCl 100 mM
EDTA 10 mM
BSA 0,2 mg/mL
S-adénosylméthionine 0,1 mM

Dans le cas du kit d'Amersham, tous les éléments du clonage de l'ADNc (sauf les colonnes et les extraits d'encapsidation *in vitro*) sont conservés à -20°C. En outre, la S-adénosylméthionine est fournie sous forme de solution mère de 100X, elle est conservée à part et ajoutée au tampon de l'ADN méthylase à la dernière minute. Le mélange de réaciton est gardé à 37°C pendant 60-90 min, puis à 70°C pendant 10 min pour inactiver l'*Eco*RI méthylase. Dans certains procédés, on extrait d'abord ce mélange au phénol-chroroforme et on le précipite avant l'étape suivante. Dans le système d'Amersham, la méthylation, l'addition des linkers *Eco*RI, et la digestion *Eco*RI se font dans le même tube.

Addition des linkers EcoRI à l'ADNc

On peut obtenir des linkers *Eco*RI [5'd(GGAATTCC)] déjà phosphorylés à l'extrémité 5'. Il existe des méthodes pour phosphoryler les linkers (par exemple Wu et collab., 1987). Il faut également l'ADN ligase de T4 (5 unités par volume de réaction de 30 µL) et le tampon pour la ligase ADN de T4 (voir Annexe 1) habituellement conservé sous forme de solution 10X. Dans la méthode d'Amersham, on utilise 1 µL de linkers *Eco*RI avec 1 µg d'ADNc dans un volume total de 30 µL. À l'ADNc, on ajoute dans l'ordre : le tampon de la ligase, les linkers *Eco*RI, l'eau et l'ADN ligase de T4. On mélange alors doucement ce mélange de réaction et on le garde à 15°C pendant 16-20 h. On arrête la réaction en chauffant à 70°C pendant 10 min pour inactiver la ligase et on conserve le milieu à -20°C lorsqu'on ne passe pas immédiatement à l'étape suivante. Wu et collab. (1987) indiquent que 1 mM de chlorure d'hexaminecobalt stimule la ligation, et ils en ont ajouté dans leur milieu de réaction.

Digestion Eco*RI de l'ADNc lié aux linkers*

À 30 µL de mélange de réaction renfermant l'ADNc lié aux linkers, ajouter d'abord 10 µL de tampon *Eco*RI (conc. 10X), de l'eau pour obtenir un volume final de 100 µL et 100 unités d'*Eco*RI. Mélanger et incuber à 37°C pendant au moins 5 h, puis chauffer à 70°C pendant 10 min pour arrêter la réaction. Le tampon de digestion *Eco*RI est le suivant :

Tris-HCl 100 mM (pH 7,5)
NaCl 50 mM
$MgCl_2$ 10 mM
BSA 0,1 mg/mL

Chez certains fournisseurs (par exemple BRL), les tampons de digestion sont fournis si l'on achète l'enzyme.

Comme on l'a décrit plus tôt, les linkers libres sont éliminés et les linkers liés à l'ADNc sont précipités en ajoutant 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 volumes d'éthanol. Après une attente d'au moins 2 h et à -20°C, le culot d'ADNc est séché et remis en suspension dans un tampon (par exemple STE) pour être lié au vecteur.

6.1.2 Ligation de l'ADNc aux bras du vecteur lambda ZAP ou lambda gt10

Dans le cas du vecteur lambda gt10

Mélange de réaction :

Insert d'ADNc avec linkers	100-500 ng
bras de lambda gt10	1 µg
tampon pour ADN ligase de T4 10X	1 µL
H_2O, quantité suffisante pour une volume de	10 µL
ADN ligase de T4	2,5 unités

Préparer le milieu de réaction sur glace.

Incuber à 15°C pendant 16-20 h.
Ajouter 1 µL d'acétate de Na 3 M et 27 µL d'éthanol absolu.
Stocker à -20°C jusqu'au moment d'utiliser.

Encapsidation *in vitro* des mélanges de ligation :

Centrifuger le mélange de réaction ci-dessus pendant 15 min. Ajouter environ 2,5 µL de tampon TE au culot sec. On peut se procurer des kits d'encapsidation chez de nombreux fournisseurs. Dans nos travaux, nous avons essayé ceux d'Amersham et ceux de Stratagene. Selon notre expérience, les extraits d'encapsidation «Gigapack Gold» de Stratagene ont donné de plus de PFU/mL. Dans le cas du système vecteur lambda gt10 ci-dessus, on ajoute 0,5 mL de tampon SM au mélange de ligation et 10 µL de chloroforme. On mélange doucement et on conserve à 4°C.

Pour le vecteur lambda ZAP

Mélange de réaction :

Insert d'ADNc avec linkers	100-500 ng (2,5 µL ou moins)
bras lambda ZAP/*Eco*RI 1 µg	(1,0 µL)
tampon pour ADN ligase de T4 10X	0,5 µL
ADN ligase de T4	3 unités
H_2O q. suff. pour	5 µL (volume final)

Conserver le mélange de réaction à la température ambiante pendant 1 h puis à 4°C jusqu'au lendemain.

Le vecteur lambda ZAP convient pour des inserts de 0 à 10 kb. Étant donné que les bras de lambda ZAP comptent environ 41 000 pb, on utiliserait 0,1 µg d'ADNc de 4000 pb pour chaque µg de bras. Dans nos travaux, nous avons encapsidé 1 µL du mélange de ligation ci-dessus à l'aide des extraits d'encapsidation Gigapack Gold de Stratagene. Après la réaction d'encapsidation, on ajoute 0,5 mL de tampon SM et 20 µL de chloroforme.

6.1.3 Titrage des recombinants

Pour le vecteur lambda gt10

Préparation des cellules hôtes :

1. Préparer en stries des cultures mères d'*E. coli* L87 et de glycérine NM514 sur L-agar des boîtes de Pétri séparées et incuber à 37°C pendant une nuit.
2. Prélever une colonie individuelle et l'ensemencer dans 10 mL de bouillon L + 0,4 % de maltose. Incuber avec agitation pendant une nuit.
3. Ajouter 1 mL à 50 mL de bouillon L + 0,4 % de maltose. Incuber à 37°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une $D.O._{600}$ de 0,5.
4. Centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 min et remettre en suspension dans 15 mL de $MgSO_4$ 10 mM glacé.
5. Mélanger et stocker à 4°C. Utiiser dans les jours qui suivent.

Pour les titrage, procéder à des dilutions du mélange final de phages encapsidés; ainsi, 30 µL dilué dans 270 µL de tampon SM équivaudrait à une dilution 10^2. Faire des dilutions en double pour chaque type de cellules-hôtes. Il faut inclure des témoins, comme de l'ADN de lambda gt10 et des bras de lambda gt sans insert. Dans le cas de l'ADN de lambda gt10 témoin, le titre sur L87, qui donne une indication de l'efficacité de la réaction d'encapsidation, doit être supérieur à $2x10^8$ pfu/µg. On calcule le degré de sélection biologique à partir du ratio des titres obtenus pour la souche L87 (hôte non sélectif) et la souche NM514 (hôte sélectif); ce ratio doit être supérieur à 100.

Dans le cas des témoins utilisant les bras de lambda gt10 (aucun insert d'ADN), on obtient la valeur de sélection pour les bras (ratio des titres L87/NM514; habituellement >100) et le titre de fond sur NM514. Ainsi, pour chaque réaction d'ADNc, on divise le titre sur L87 par le ratio de sélection pour les bras pour obtenir la véritable valeur de fond sur NM514 si aucun recombinant n'avait été formé. On obtient le nombre de recombinants en soustrayant la valeur de fond du titre obtenu sur NM514. Le pourcentage de recombinants sur NM514 représente la différence des titres sur NM514 avant et après la soustraction de la valeur de fond. On peut alors calculer le nombre de recombinants par µg d'ADNc. Dans nos études, nous avons également utilisé des souches d'*E. coli* C600 qui ont donné de bons résultats (voir Pitel et Cheliak, 1988b).

Pour vérifier la taille des inserts d'ADNc et pour obtenir une autre valeur pour le pourcentage de recombinants, on choisit des plages au hasard, on extrait l'ADN et on l'analyse par électrophorèse sur agarose comme il est décrit plus bas (sections 6.3 et 6.5).

Pour le vecteur lambda ZAP

Préparation des cellules-hôtes :

1. Ensemencer en stries des cellules d'*E. coli* BB4 et XL-1 Blue dans des boîtes de LB/tetracycline (12,5 µg/mL) et incuber à 37°C jusqu'au lendemain.
2. Prélever une colonie individuelle et incuber pendant une nuit avec agitation à 30°C dans un milieu TB renfermant 0,2 % de maltose et 10 mM de $MgSO_4$.
3. Centrifuger les cellules à 1000 X g pendant 10 min et remettre doucement en suspension dans 10 mM de $MgSO_4$ (0,5 volume).

La souche BB4 est une souche $RecA^+$. La souche XL1-Blue est une souche Rec-A- utilisée pour les clones exigeant une souche négative comme souche recombinante. Les deux souches renferment l'épisome F', lequel est nécessaire pour la sélection de la couleur et l'excision

automatique pour incorporation dans un plasmide pBluescript à la suite d'une surinfection par un phage helper M13.

Pour ce qui est du mélange final encapsidé, ensemencer 1 µL du mélange de la réaction finale d'encapsidation (dans un tampon SM) sur un tapis bactérien BB4 :

1. Incuber le phage et 200 µL d'une suspension de cellules BB4 présentant une $D.O._{600}$ de 0,5 à 37°C pendant 15 min.
2. Ajouter 2-3 mL de gélose molle (48°C), 50 µL d'IPTG 0,5 M et 50 µL de X-Gal 250 mg/mL.
3. Ensemencer sur agar NZY dans des boîtes Petri et incuber à 37°C pendant 6 à 16 h. Les plages témoins sont bleues.

Procédé de l'excision automatique de l'ADN de phagemide :

1. Prélever la plage et la transférer dans une microtube à centrifuger de 1,5 mL renferment 500 µL de tampon SM et 20 µL de chloroforme. Passer au vortex pour libérer les particules de phage lambda ZAP. Garder à 4°C.
2. Dans un tube de 50 mL, ajouter

   200 µL de cellules XL1-Blue de $D.O._{600} = 1,0$
   200 µL de stock de phage ZAP
   10 µL de phage helper R408
   Incuber à 37°C pendant 15 min.

3. Ajouter 5 mL de milieu YT 2X et incuber à 37°C avec agitation pendant 4 à 6 h.
4. Chauffer à 70°C pendant 20 min, puis centrifuger à 1000 tr/min pendant 5 min.
5. Décanter le plasmide pBlue script (encapsidé dans une particule de phage M13 ou f1) dans un tube stérile. Garder à 4°C et utiliser avant 2 mois.
6. Pour cultiver le plasmide obtenu, ajouter dans un tube de 15 mL :

   200 µL de cellules XL1-Blue de $D.O._{600} = 1,0$
   200 µL de stock de phage de l'étape 5
   Incuber à 37°C pendant 15 min.

7. Ensemencer en stries dans des boîtes LB/Ampicilline et incuber à 37°C jusqu'au lendemain. Les colonies renferment le plasmide pBluescript avec l'insert cloné.

Extraction des plasmides pBluescript

Pour obtenir une matrice d'ADN double brin appropriée pour la digestion par un enzyme de restriction ou séquençage enzymatique :

1. Incuber une culture de 3 mL jusqu'au lendemain dans un milieu LB renfermant de l'ampicilline (100 µg/mL).
2. Centrifuger 1,5 mL à 4°C pendant 3 min.
3. Remettre le culot en suspension dans 110 µL de tampon STETL

Sucrose	8 %
Triton X-100	5 %
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA	50 mM

On ajoute de la poudre de lysozyme à la fin (environ 50 µg).

4. Mettre le tube à 100°C pendant 30 sec.
5. Centrifuger à 4°C pendant 15 min.
6. Ajouter 110 µL d'isopropanol au surnageant et centrifuger immédiatement pendant 15 min.
7. Remettre en suspension dans 25 µL de TE pour la digestion avec l'enzyme de restriction ou pour une purification ultérieure.
8. Extraire deux fois avec un volume égal de phénol-chloroforme (1:1) et une fois avec du chloroforme seul.
9. Ajouter un volume égal d'acétate d'ammonium 7,5 M et précipiter avec 2,5 volumes d'éthanol. Garder sur glace et centrifuger à 4°C pendant 20 min.
10. Rincer avec 1 mL d'éthanol à 80 % et centrifuger pendant 1 min.
11. Sécher les culots sous vide et remettre en suspension dans 15 µL de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) et 0,1 mM d'EDTA.
12. Pour le séquençage, utiliser 5 µL (environ 2 µg).

Remarque : On peut utiliser d'autres méthodes, sur une petite ou une grande échelle (voir la section 6.5; kit BIO 101 de Bio/Can; Maniatis et collab., 1982).

Préparation d'ADNsb à partir de cellules renfermant le plasmide pBluescript.

1. Incuber toute une nuit une culture renfermant l'ADN du plasmide pBluescript (utiliser également le plasmide pBluescript sans insert comme témoin) sur la souche XL1-Blue. Pour sélectionner l'épisome F', cultiver en présence de 10 µg de tétracycline par mL. Utiliser immédiatement la culture après une incubation d'une nuit.
2. Ensemencer 3 µL de YT 2X avec 300 µL de la culture ci-dessus et agiter à 37°C dans un tube stérile de 50 mL.
3. Ajouter le phage helper (par exemple R408 de Stratagene) à la culture au cours de la phase logarithmique ($D.O._{600} = 0,3$) à un rapport d'infection de 20:1 (phage par rapport aux cellules). Poursuivre l'agitation pendant 8 h.
4. Transférer dans un tube Eppendorf et centrifuger pendant 15 min. Transférer le surnageant dans un autre tube et centrifuger à nouveau pendant 15 min.

Transférer le surnageant dans un autre tube et ajouter 1/4 de volume d'acétate d'ammonium 3,5 M (pH 7,5), renfermant 20 % de PEG.
Mélanger en retournant et laisser à la température ambiante pendant 15 min.

5. Centrifuger les tubes à 11 000 tr/min et égoutter le surnageant. Centrifuger brièvement et enlever toute trace restante de surnageant.
6. Remettre le culot en suspension dans 200 µL de tampon TE. Ajouter 200 µL de phénol saturé de tampon-chloroforme, passer au vortex pendant 1 min et centrifuger pendant 5 min.
7. Prélever la phase aqueuse supérieure et transférer dans un autre tube. Répéter l'extraction jusqu'à l'absence d'interface.
   Ajouter 200 µL de chloroforme, passer au vortex pendant 1 min et centrifuger pendant 2 min. Transférer la phase aqueuse dans un autre tube.
8. Précipiter l'ADNsb en ajoutant 150 µL d'acétate d'ammonium 7,5 M (pH 7,5) et 600 µL d'éthanol froid à 100 %. Laisser sur glace pendant 15 min.
9. Centrifuger à 4°C pendant 20 min, égoutter le surnageant et laver le culot avec de l'éthanol à 80 %. Sécher sous vide et dissourre le culot dans 20 µL d'eau désionisée. Transférer dans un autre tube.
10. Analyser l'ADNsb sur gel d'agarose à 1 %. Le VCSM13 et le R408 migrent jusqu'à environ 4 Kb alors que le pBluescript sans insert migre à environ 1,6 Kb.

6.2 Extraction de l'ADN phagique sur une petite échelle

6.2.1 Méthode de culture en milieu liquide

1. À l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une plage et l'ajouter à 0,5 mL de cellules-hôtes NM514 fraîchement préparées (voir la section 6.1.3) dans un tube en polypropylène stérile de 15 mL. Laisser à la température ambiante pendant 15 min.
2. Ajouter 5 mL de bouillon L renfermant 5 mM de $CaCl_2$ (ajouter 1 mL de $CaCl_2$ 500 mM stérile dans 100 mL de bouillon L stérile froid).
3. Incuber à 37°C avec agitation pendant 4 h.
4. Ajouter quelques gouttes de chloroforme et agiter 5 minutes de plus.
5. Centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 min et mettre le surnageant dans un tube de polypropylène (par exemple Falcon). Conserver à 4°C.
6. Ajouter au surnageant ci-dessus un volume égal de tampon SM renfermant 20 % de PEG et 2 M de NaCl. Mélanger et incuber sur glace pendant 1 h.
7. Centrifuger à 3000 tr/min pendant 20 min. Égoutter le culot et essuyer l'intérieur du tube pour éliminer toutes les traces de PEG.
8. Remettre le culot en suspension dans 750 µL de bouillon L. Verser dans un microtube à centrifuger de 1,5 mL.
9. Ajouter 750 µL de DE52 dans un bouillon L. Mélanger doucement en retournant 30 fois.
10. Centrifuger pendant 5 min et verser le surnageant dans un autre tube. Répéter cette dernière étape.
11. À 750 µL de surnageant, ajouter 13 µL d'une solution de protéinase K à 0,1 mg/mL et 32 µL de SDS à 10 %. Mélanger et laisser à la température ambiante pendant 15 min.
12. Ajouter 130 µL d'acétate de potassium. Retourner plusieurs fois et incuber à 88°C pendant 20 min. Refroidir sur glace pendant 10 min.
13. Centrifuger pendant 10 min et transférer 800 µL de surnageant dans un autre tube. Ajouter un volume égal d'isopropanol froid et garder à -70°C pendant au moins 10 min.
14. Centrifuger pendant 10 min, sécher le culot brièvement et remettre l'ADN phagique en suspension dans un tampon TE. Dans le cas d'une digestion *Hind*III, il ne faut analyser que 5 à 10 % du culot. Dans le cas d'une digestion *Eco*RI et d'une analyse non radioactive par électrophorèse, tout le culot doit être utilisé.

6.2.2 Méthode de lyse des plages

1. Prélever une plage à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et ajouter 1 mL de tampon SM.
2. Ajouter une goutte de chloroforme, agiter et laisser à 4°C pendant 1 h.
3. Absorber environ 10^5 pfu sur des cellules fraîches appropriées (par exemple 514) et ensemencer.
4. Incuber à 37°C pendant 8 h ou jusqu'au lendemain, ajouter 5 mL de tampon SM, boucher et agiter doucement à 4°C pendant 2 à 3 h.
5. Mettre le lysat (dans le tampon SM) dans un tube stérile. Rincer la boîte avec 1 mL de tampon SM.
6. Ajouter quelques gouttes de chloroforme, passer brièvement au vortex et centrifuger à 4000 tr/min à 4°C pendant 10 min.
7. Ajouter une goutte de chloroforme au surnageant et garder à 4°C.

6.3 Amplification et conservation des banques

Études à l'aide du vecteur lambda gt10 :

1. Ensemencer les phages sur des cellules NM514 ou C600 à raison de $3x10^5$ recombinants par grande boîte de Pétri carrée (par exemple Nunc 23x23 cm).
2. Incuber à 37°C jusqu'à l'apparition et la fusion des plages. Les plages ne doivent pas trop s'élargir.
3. Ajouter 50 mL de tampon SM par boîte et laisser à 4°C jusqu'au lendemain.
4. Enlever le tampon, laver la boîte avec 10 mL de tampon SM et garder sous chloroforme à 4°C

jusqu'au lendemain. Le titre doit atteindre $5x10^{11}$ pfu/mL.

Études à l'aide du vecteur lambda ZAP :

1. Ensemencer les phages sur des cellules de BB4 (ou de la souche recA-XL1-Blue si des recombinaisons risquent de se produire) à raison de $3x10^5$ recombinants par grande boîte carrée. On mélange des aliquotes des clones lambda encapsidés avec 2 mL de cellules BB4 de $D.O._{600}$ = 0,5/mL dans un tube en polypropylène de 50 mL.
2. Incuber les tubes à 37°C pendant 15 min.
3. Mélanger 30 mL de gélose molle fondu (48°C) avec les bactéries infectées et étendre dans des boîtes de gélose NZY.
4. Incuber les boîtes à 37°C pendant 5 à 8 h jusqu'à ce que les plages apparaissent et deviennent confluentes.
5. Ajouter 40 mL de tampon SM dans chaque boîte et conserver à 4°C jusqu'au lendemain.
6. Prélever la suspension de bactériophages et mettre dans des récipients stériles en polypropylène ou en verre. Rincer la boîte avec 10 mL de tampon SM frais et ajouter à la suspension. Ajouter du chloroforme jusqu'à l'obtention d'une concentration de 5 % et incuber pendant 15 min à la température ambiante.
7. Centrifuger à 4000 tr/min pendant 5 min pour éliminer les débris cellulaires.
8. Prélever le surnageant, l'ajouter à la suspension, ajouter du chloroforme jusqu'à l'obtention d'une concentration de 0,3 % et garder sous formes d'aliquotes à 4°C.

6.4 Caractérisation des inserts d'ADNc sur gels d'agarose

La digestion de l'ADN phagique par l'enzyme de restriction *Eco*RI libère les inserts. Si ces derniers sont difficiles à voir, on peut les marquer avec des isotopes radioactifs. En outre, on peut digérer l'ADN par les enzymes *Hind*III ou *Bam*HI. Dans le cas du phage lambda gt10, ces enzymes libèrent respectivement un fragment de 6,5 Kb et un fragment de 6,1 Kb, lesquels renferment le site de clonage *Eco*RI et tout insert présent. La présence d'inserts modifie la taille de ces bandes. Pitel et Cheliak (1988b) en donnent un exemple.

Réaction de digestion :

À 20 µL d'ADN phagique, ajouter
3 µL de tampon pour enzyme (x10)
6 unités d'enzyme
X mL d'eau, q. suff. pour 30 µL
Incuber à 37°C pendant 2 h.

Chauffer à 70°C pendant 10 min et séparer sur gel (1,5-2 % d'agarose pour les digestés *Eco*RI ou 0,8 % d'agarose pour les digestés *Hind*III ou *Bam*HI) ou marquer de la façon suivante :

Réaction de marquage :

0,1 µL de (α-^{32}P)dATP (10 µCi/µL)
1 unité d'ADN polymérase I, le fragment de Klenow
X µL d'eau, q. suff. pour 2,5 µL
Ajouter la solution ci-dessus à chaque digesté *Eco*RI de 30 µL et incuber à 30°C pendant 30 min.
Analyser sur gel d'agarose à 1,5 %
Fixer dans un TCA à 7 % pendant 30 min, sécher et autoradiographier.

6.5 Préparation d'ADN plasmidique sur mini-prep

La méthode suivante est essentiellement celle décrite par Birnboim et Doly (1979).

1. A l'aide d'un fil à boucle stérile permettant de transférer une seule colonie, ensemencer 2 mL de bouillon L renfermant un antibiotique approprié et incuber jusqu'au lendemain à 37°C sous agitation.
2. Transférer 1 à 1,5 mL dans un microtube à centrifuger et centrifuger pendant 2 à 3 min. Remettre le culot en suspension (par exemple en utilisant un Pipetman) dans 100 µL de solution de lyse :

   Tris-HCl 25 mM (pH 8,0)
   EDTA 10 mM (pH 8,0)
   glucose 50 mM
   lysozyme, 2 mg/mL (ajouter au dernier moment)
   Conserver sur glace pendant 30 min.

3. Ajouter 200 µL de SDS alcalin à la température ambiante :

   SDS 1 % (p/v) dans NaOH 0,2 M
   Mélanger le contenu du tube en retournant et conserver sur glace pendant 5 min.

4. Ajouter 150 µL d'acétate de sodium 3 M (pH ajusté à 4,8 à l'aide d'acide acétique glacial) et mélanger doucement en retournant le tube. Incuber sur glace pendant 60 min.
5. Centrifuger pendant 5 min à la température ambiante et transférer 400 µL de surnageant (en évitant le précipité blanc qui flotte parfois dessus) dans un autre tube.
6. Ajouter 1 mL d'éthanol et garder à -70°C pendant au moins 1 h.
7. Centrifuger à 4°C et enlever le surnageant avec soin.
8. Remettre le culot en suspension dans 100 µL d'acétate d'ammonium 0,1 M (pH 6,0), ajouter 300 µL d'éthanol froid et garder à -70°C pendant au moins 30 min.

9. Centrifuger et jeter le surnageant comme ci-dessus. Sécher le culot et remettre en suspension dans un tampon TE.
10. Dans le cas des digestés d'enzyme de restriction, on peut ajouter de la RNAse (20 µg/mL).

6.6 Remarques sur la croissance et la conservation d'*E. coli* et du phage lambda

La croissance d'*E. coli* passe par une phase initiale de latence, une période de croissance exponentielle, puis par une phase stationnaire. On peut mesurer cette croissance (la turbidité) à 600 nm. Même si *E. coli* peut croître dans des conditions anaérobies, il faut fournir une aération énergique pour obtenir le taux de croissance maximal dans tous les milieux. Le volume de la culture doit être inférieur à 25 % de la taille de récipient. Il faut garder les conditions de croissance constantes pour empêcher la prolifération de bactéries à différents stades physiologiques.

Il ne faut pas conserver les colonies d'*E. coli* plus de 10 jours dans des boîtes de Pétri L à 4°C, car la viabilité des cellules diminue rapidement. Les souches utilisées fréquemment peuvent être gardées jusqu'à un mois en suspension dans un $MgSO_4$ de 10 mM à 4°C (Silhavy et collab., 1984). Toutefois, dans le procédé décrit par Amersham dans le cas des cellules NM514, on suggère de n'utiliser que des cellules fraîchement préparées étant donné que la conservation des cellules à 4°C jusqu'à une semaine réduit significativement le taux d'encapsidation et la sélection biologique. À long terme, il faut les garder à -70°C dans des flacons de congélation en plastique à bouchon à vis. Il faut ainsi mettre dans chaque flacon 0,4 mL d'une culture d'une nuit et 0,6 ml de glycérol à 20 %; prévoir au moins deux flacons pour chaque échantillon et conserver ceux-ci dans des congélateurs différents. Même s'il est possible de congéler et décongeler les flacons plusieurs fois, il est conseillé de gratter la culture congelée pour obtenir l'aliquote nécessaire à l'ensemencement.

En général, il faut des cellules en phase logarithmique pour la croissance lytique du phage lambda; des cellules en phase stationnaire sont utilisées pour obtenir des lysogènes. Pour obtenir des cellules en phase logarithmique le lendemain, Silhavy et collab. (1984) suggèrent de les incuber à 30°C pour ralentir leur croissance et d'utiliser un milieu moins riche, comme le milieu TB. Dans un milieu TB, les cellules cessent de croître à une $D.O._{600}$ d'environ 0,5-0,6. Ils ont également précisé que les boîtes L donnent des plages plus petites et moins uniformes que les boîtes TB. Toutefois, pour obtenir des lysats de lambda liquides, il faut utiliser le milieu L. Le bactériophage lambda s'adsorbe sur une protéine dite LamB (le produit du gène lamB) de la membrane externe d'*E. coli*. Les souches dépourvues de cette protéine sont résistantes au phage lambda (lambda^r). Le gène lamB peut être induit par le maltose. Ainsi, lorsque les cellules sont cultivées en présence de 0,2 % de maltose, plusieurs milliers de récepteurs sont produits, comparativement à quelques centaines seulement par cellule en absence de maltose. L'adsorption du phage lambda est indépendante de la température, alors que l'injection exige une température de l'ordre de 37°C. Les phages lambda ne forment donc pas de plages à la température ambiante. Les ions de magnésium sont également requis pour la stabilité des phages et leur adsorption à *E. coli*, alors que le Ca^{++} est un inhibiteur compétitif. L'adsorption peut également se produire avec des cellules mortes ou des débris cellulaires si la protéine LamB est présente. Des concentrations de sel supérieures à 0,5 M inhibent l'adsorption.

La meilleure méthode de conservation du phage lambda consiste à les garder dans des boîtes de Pétri ou sous forme de cultures liquides (voir section 6.3) protégés contre la lumière et hermétiquement fermés à 4°C. On peut ainsi les conserver pendant des années. Bien que les lysats soient stérilisés au chloroforme, il faut éviter d'en mettre à l'excès, car le chloroform se décompose par photolyse et donne des composés létaux pour le phage lambda. Les lysats doivent être autant que possible exempts de débris bactériens pour empêcher une réduction du titre par adsorption. Pour une conservation à long terme, il est préférable de congéler à -70°C ou dans l'azote liquide. Il faut utiliser des flacons de congélation en plastique à bouchon à vis et ajouter 70 µL de DMSO et 1 mL de lysat de phages. Congeler au moins deux flacons par lysat et garder si possible dans des congélateurs différents. Même si le phage lambda supporte plusieurs cycles de congélation et décongélation sans perte de viabilité notable, il est préférable, lorsqu'on veut réaliser un ensemencement, d'ouvrir un flacon congelé et de gratter un peu de lysat congelé au moyen d'un fil à boucle ou d'un cure-dent stérile et de le mettre en suspension dans un tampon approprié.

7. Procédés d'hybridation par soustraction

7.1 Préparation de l'ADNc marqué

On prépare de l'ADNc marqué d'activité spécifique élevée pour les études d'hybridation après le transfert ou de faible activité spécifique pour certaines études de clonage (Davis et collab., 1981)

Milieu de réaction pour l'ADNc simple brin (100 µL) :

1-5 µg d'ARN poly $(A)^+$ dans un Tris-HCl de 50 mM (pH 8,3)
$MgCl_2$ 6 mM
NaCl 60 mM (ou KCl 70 mM pour les études de clonage de l'ADNc)
dATP 1 mM
dGTP 1 mM

dTTP 1 mM
500 µCi de [α-^{32}P] dCTP (concentration finale de 6 mM) pour l'hybridation après le transfert ou des traces seulement pour les études de clonage de l'ADNc dCTP 30 mM (ou 1 mM pour les études de clonage de l'ADNc)
oligo dt 10 µg/mL
dithiothréitol 20 mM
actinomycine D 100 µg/mL
Ajouter 10 unités de transcriptase inverse par µg d'ARN poly (A)$^+$ et incuber à 42°C pendant 2 h.

Remarque : On peut également faire appel à d'autres procédés de synthèse d'ADNc (celui d'Amersham par exemple que l'on a déjà décrit).

1. Ajouter à l'ADNc ci-dessus un volume égal de NaOH 0,2 M et incuber à 70°C pendant 20 min pour hydrolyser l'ARN.
2. Refroidir sur glace, neutraliser au moyen de HCl 1 M, ajouter de l'acétate de Na (pH 6,5) de façon à obtenir 0,2 M et du $NaDodSO_4$ de façon à obtenir une concentration de 0,1 %.
3. Réchauffer à la température ambiante et éliminer l'ADNc marqué au moyen d'une colonne de Sephadex G50 dans une pipette Pasteur, en utilisant le tampon d'élution suivant :

   NaCl 100 mM
   Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)
   EDTA 1 mM
   $NaDodSO_4$ 0,02 %

4. Ajouter 50 mg d'ARNt comme vecteur et précipiter l'ADNc dans un tube Eppendorf silanisé.
5. Laver le précipité à l'éthanol à 70 %, sécher et remettre en suspension dans l'eau.

Remarque : Dans les études d'hybridation après le transfert, on laisse fragmenter l'ADNc marqué (1,8 x 10^8 CPM/µg) pendant deux semaines.

Sargent (1987) a décrit une autre methode de préparation d'ADNc marqué, lequel doit être utilisé uniquement comme sonde d'hybridation. Étant donné qu'il faut un ADNc marqueur d'activité spécifique élevée (>10^8 cmp/µg), on utilise de faibles concentrations de dNTP dans le milieu de réaction. Par conséquent, on est obligé à utiliser des oligodésoxynucléotides de séquence aléatoire comme amorce, au lieu d'oligo(dT), pour prévenir les biais artificiels dus aux séquences à extrémités 3' prédominantes des ADNc plus petits qui sont produits. L'ADNc d'amorce aléatoire s'obtient de la façon suivante :

5 mCi/mL de [^{32}α-P]dCTP (3000 Ci/mmole)
20 µM de cCTP non marqué
200 µM de dATP, de dGTP et de dTTP
20 mM de DTT
50 mM de Tris-HCl (pH 7,5)
75 mM de KCl
3 mM de $MgCl_2$
10 µg/mL d'ARN poly(A)$^+$
300 µg/mL d'amorce aléatoire
6000 U/mL de transcriptase inverse de MMLV (BRL)

Incuber à 37°C pendant 1 h et hydrolyser l'ARN au moyen d'un volume égal de NaOH 0,6 N renfermant 20 mM d'EDTA. Incuber à 65°C pendant 30 min, puis chromatographier sur Sephadex G-50 dans un tampon NETS pour éliminer les molécules marquées non incorporées. En utilisant une amorce de séquence aléatoire, on peut obtenir des valeurs de 10^{10} cpm d'ADNc à partir de 0,5 µg d'ARNm poly(A)$^+$ par soustraction avec au moins 10 µg d'ARNm utilisé comme entraîneur. On utilise habituellement un ratio ARN/ADNc de 30:1.

Il ne faut que quelques centaines de milliers de cpm d'ADNc obtenu par soustraction pour l'hybridation dans une banque, car l'ADNc obtenu par soustraction ne renferme que les séquences d'intérêt et ne représente qu'une faible partie de l'ADNc non fractionné. Étant donné que le bruit de fond est réduit, il est possible d'utiliser des temps d'exposition plus longs. Si plus de 95 % de l'ADNc original est éliminé, on peut déceler des ARNm rares représentant seulement 0,01 % ou moins de l'ARNm cellulaire total. Pour un ARNm représentant 0,02 % de l'ARNm total, il faut cribler 50 000 clones.

7.2 Création de banques d'ADNc obtenues par clonage directionnel et isolement de l'ADN phagique recombinant

Après la construction de l'ADNc à l'aide de l'amorce-adaptateur oligo (dT)-*Xba*I (Promega), l'addition des linkers *Eco*RI et la digestion finale avec *Eco*RI et *Xba*I, l'ADNc est lié à un vecteur approprié présentant des bras *Eco*RI-*Xba*I compatibles pour un clonage directionnel. Dans nos études, nous avons utilisé jusqu'à maintenant le vecteur lambda GEM™-4 de Promega. Le mélange de ligation comprend les ingrédients suivants :

0,5 µg de bras lambda GEM™-4
0,15 µg d'ADNc (ou d'insert témoin pGEM™-3)
1,0 µL de tampon pour ligase 5X
1,0 µL de DNA ligase de T4
H_2O q. suff. pour 5,0 µL de volume final

Pour vérifier le bruit de fond, omettre l'insert témoin.

Incuber le mélange de ligation à la température ambiante pendant 3 h et procéder à l'encapsidation selon les instructions du frabriquant. Au mélange d'encapsidation, ajouter 0,5 mL de tampon SM et 25 µL de chloroforme. Titrer le phage dans des boîtes TB renfermant des cellules-hôtes de la souche LE392. Ajouter une seule colonie de LE392 à 50 mL de milieu TB additionné de 0,5 mL de $MgSO_4$ 1 M et de 1 mL de maltose stérile à 20 %, puis agiter à 30°C jusqu'au lendemain. Après la centrifugation, les bactéries sont gardées à 4°C pendant quelques jours dans un $MgSO_4$ 10 mM. Pour l'ensemencement, ajouter 100 µL de suspension de phages diluée à 100 µL de cellules-hôtes LE392 et incuber à 37°C pendant 30 min, puis ajouter la gélose molle TB (45°C).

Après la création de la banque, on peut fabriquer des sondes d'ARN orientées à partir de clones individuels ou de la banque complète. Dans le procédé suivant fourni par Promega, on synthétise environ 30 à 150 µg d'ARN. Voici comment isoler de l'ADN phagique recombinant :

Méthode 1

1. Obtenir 100 mL de culture de lysat de phages ou utiliser des lysats obtenus dans des boîtes de Pétri.
2. Centrifuger à 8000 tr/min pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires.
3. Ajouter 0,9 mL de LambdaSorb (Promega)/90 mL de lysat, mélanger et mettre sur glace pendant 30 min.
4. Centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 min et remettre le culot en suspension dans 10 mL de tampon SM pour phage. Centrifuger à 12 000 tr/min pendant 2,5 min et répéter.
5. Remettre les culots en suspension dans un Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) renfermant 10 mM d'EDTA. Chauffer à 70°C pendant 5 min pour libérer l'ADN phagique.
6. Centrifuger pendant 2 min et transférer le surnageant dans un autre tube.
7. Extraire une fois avec un volume de phénol-chloroforme (1:1) saturé de tampon TE. Passer au vortex pendant une minute et centrifuger à 12 000 tr/min pendant 5 min.
8. Extraire la phase aqueuse avec 1,0 volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Passer au vortex pendant une minute et centrifuger. Répéter l'extraction avec du chloroforme.
9. Ajouter 0,5 vol de NaCl 5 M a la phase aqueuse et mélanger.
10. Ajouter 0,33 voume de PEG (PM=8000) à 30 % dans un NaCl 1,5 M. Bien mélanger et mettre sur glace pendant 30 min.
11. Centrifuger à 12 000 tr/min pendant 5 min, laver le culot avec 1 mL d'éthanol à 70 % et sécher brièvement le culot.
12. Remettre l'ADN en suspension dans 100 µL d'eau. Le rendement est d'environ 30 à 60 µg par 100 mL de lysat liquide.

Méthode 2

La méthode suivante est celle décrit par J. Byrne (comm. pers.), modifiée à partir d'autres sources bibliographiques.

1. Préparer 3 grandes boîtes Nunc (23x23 cm) en utilisant le milieu et les cellules-hôtes de son choix. Utiliser 7,5 x 10^6 unités formant plage (pfu) par grande boîte. Laisser à 37°C (après avoir ajouté la gélose molle, les cellules-hôtes et les phages) pendant 5 à 6 h jusqu'à ce que les boîtes aient l'apparence d'un tapis troué. Ne pas laisser croître trop longtemps.
2. Refroidir les boîtes à 4°C et recouvrir de 40 mL de diluant lambda et de plusieurs gouttes de chloroforme (le diluant lambda comprend 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de $MgCl_2$ et 0,1 mM de Na_2EDTA). Garder à 4°C jusqu'au lendemain.
3. Enlever la solution de recouvrement et sédimenter les débris bactériens par centrifugation à 10 000 tr/min à 4°C pendant 15 min.
4. Sédimenter le phage en centrifugeant à 23 000 tr/min à 4°C pendant 90 min.
5. Remettre chaque culot en suspension dans 0,5 mL de diluant lambda et attendre jusqu'au lendemain. Ajouter 0,75 g de CsCl par mL de suspension.
6. Centrifuger à 54 000 tr/min à 4°C pendant 6 h.
7. Prélever la bande dans le tube et dialyser à 4°C jusqu'au lendemain contre le tampon TE (changer le tampon deux fois).
8. Mettre 0,5 mL dans chaque microtube à centrifuger.
9. Ajouter 10 µL de SDS à 10 % et 1 goutte de Protéinase K (3 mg/mL, conservée dans un glycérol à -20°C).
10. Incuber à 37°C pendant 30 min.
11. Extraire avec du phénol-chloroforme (2X) et du chloroforme (1X). Ajouter 1/10 de volume d'acétate de Na 3 M et deux volumes d'éthanol froid.
12. Centrifuger et dissoudre le culot dans 500 mL de TE. Cela peut prendre 1 à 2 jours à 4°C. Utiliser 5 µL pour la mesure de la D.O.

Digestion de l'ADN :

1. Digérer 20 µg d'ADN avec *Xba*I (pour transcrire avec l'ARN polymérase de T7 et ainsi obtenir de l'ARN sens) à 37°C pendant 1 h.
2. Extraire une fois avec du phénol-chloroforme (1:1) et deux fois avec du chloroforme-alcool isoamylique (24:1).
3. Précipiter l'ADN avec 0,5 volume d'acétate de NH4 7,5 M puis deux volumes d'éthanol.
4. Conserver à -20°C pendant 30 min et centrifuger à 12 000 tr/min pendant 15 min.

5. Laver le culot avec de l'éthanol à 70 % et sécher sous vide. Remettre le culot en suspension dans 30 µL de H_2O.

7.3 Réaction de transcription

1. À 30 µl d'ADN digéré, ajouter :

   60 µL de tampon pour transcription 5X
   30 µL de DTT 100 mM
   75 µL d'ATP, de GTP, d'UTP et de CTP 2,5 mM chacun
   12 µL de RNasine, 300 U
   15 µL d'ARN polymérase de T7, 300 U

2. Ajouter de l'eau traitée au DEPC pour obtenir un volume final de 300 µL et incuber à 37°C pendant 2 h.
3. Ajouter 30 unités de DNase RQ1 exempte de RNase et incuber à 37°C pendant 15 min.
4. Arrêter la réaction en ajoutant un volume égal de phénol-chloroforme (1:1) saturé de tampon TE.
5. Passer au vortex pendant 1 min et centrifuger à 12 000 tr/min pendant 5 min.
6. Extraire la phase aqueuse avec un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Passer au vortex et centrifuger.
7. Ajouter 0,5 volumes d'acétate de NH4 7,5 M à la phase aqueuse, puis trois volumes d'éthanol.
8. Mettre à -20°C pendant 30 min et centrifuger à 12 000 tr/min pendant 15 min.
9. Laver le culot à l'éthanol à 70 % et sécher sous vide. Remettre le culot en suspension dans 100 µL d'eau traitée au DEPC et conserver à -20°C ou à -70°C.
10. Fabriquer de l'ADNc à l'aide de la transcriptase inverse, puis par hydrolyse des bases.

7.4 Réactions d'hybridation

1. Silaniser des tubes capillaires en verre (pouvant contenir 20 µL de solution), ou utiliser des microtubes à centrifuger à bouchon à vis silanisés, compléter le volume avec de l'huile de paraffine et boucher.
2. Dissoudre l'ARNm (1 µg/mL) dans un tampon phosphate 0,5 M renfermant 5 mM d'EDTA et 0,1 % de SDS.
3. Porter à ébullition et maintenir l'ébullition pendant 60 sec pour désagréger l'ARN.
4. Incuber les milieux de réactions à 68°C pendant 20 à 24 h.
5. Fractionner par chromatographie sur hydroxyapatite dans un tampon phosphate 0,12 M renfermant 0,1 % de SDS à 60°C. L'ADNc (fraction double brin) se fix à la colonne.
6. Concentrer la fraction simple brin au moyen de sec-butanol, extraire au $CHCl_3$ pour éliminer le butanol, puis aérer pour élminer le $CHCl_3$.

   Dans le cas des études d'hybridation après le transfert, le matériel obtenu à l'étape 7 est hybridé par le transfert Southern.
7. Faire passer la fraction simple brin à travers une colonne de Sephadex G-50F (dans une pipette Pasteur) pour éliminer le tampon phosphate qui autrement inhiberait la précipitation.
8. Ajouter 50 µg d'ARNt comme entraîneur et précipiter l'ADNc simple brin.
9. Remettre en suspension dans l'eau et rendre le double brin à l'aide des méthodes habituelles. Procéder au clonage. Promega offre d'autres procédés, comme celui où une amorce de T7 est requise.

Invitrogen offre un kit d'hybridation de l'ADNc par soustraction qui est censé comporter des améliorations par rapport aux autres méthodes. Cette méthode n'exige pas le clonage directionnel de l'ADNc. On construit d'abord deux banques dans des vecteurs du type phagemide, l'une à partir du tissu A (tissu induit) et l'autre à partir du tissu B (tissu non induit). On purifie alors de l'ADN simple brin de chaque banque à l'aide du phage helper M13. L'ADN simple brin de la banque B est photobiotinylé puis hybridé à l'ADN simple brin de la banque A. L'ADN duplex biotinylé obtenu et l'ADN simple brin du tissu B sont éliminés par un traitement à la streptavidine suivi d'une extraction au phénol. L'ADN duplex-photobiotine-streptavidine se retrouve dans la phase phénol alors que l'ADN simple brin non hybridé du tissu A reste dans la phase aqueuse et il est alors transformé dans une souche *E. coli* compétente pour produire une banque par soustraction.

Remarques : L'hydroxyapatite, une forme de phosphate de calcium insoluable, retient plus fortement les molécules double brin que les molécules simple brin. Les molécules d'ADNc simple brin et double brin peuvent être libérées au moyen de tampons phosphate. La chromatographie est effectuée dans une colonne réchauffée par l'eau maintenue à 55-60°C, renfermant 0,5 g d'hydroxyapatite (HTPgrade, Bio-Rad) par 100 µg d'ARN. Une fois la réaction d'hybridation terminée, le milieu de réaction est dilué dans 0,5 mL de NaH_2PO_4 0,12 M (pH 6,8) et déposé sur la colonne. L'ADNc simple brin passe dans la colonne sans pratiquement être retenu; on récupère les traces qui ont été retenues en lavant la colonne avec plusieurs volumes de NaH_2PO_4 0,12 M.

Remerciements

Les auteurs désirent remercier K.W. Hutchison, D.J. Gifford et L. DeVerno d'avoir révisé le manuscrit.

Bibliographie

Aspart, L.; Meyer, Y.; Laroche, M.; Penon, P. 1984. Developmental regulation of the synthesis of proteins encoded by stored mRNA in radish embryos. Plant Physiol. 76:664-673.

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. 1989. Current protocols in molecular biology. Volume 1, unit 4.5. John Wiley and Sons.

Baker, J.C.; Dure, L. III. 1987. DNA and amino acid sequences of some ABA responsive genes expressed in late embryogenesis in cotton cotyledons. Pages 57-62 *in* Molecular Biology of Plant Growth Control. Alan R. Liss. Inc.

Bartels, D.; Thompson, R.D. 1983. The characterization of cDNA clones coding for wheat storage proteins. Nucleic Acids Research. 11:2961-2977.

Bartels, D.; Thompson, R.D. 1986. Synthesis of mRNAs coding for abundant endosperm proteins during wheat grain development. Plant Sci. 46:117-125.

Baulcombe, D.C.; Key, J.L. 1980. Polyadenylated RNA sequences which are reduced in concentration following auxin treatment of soybean hypocotyls. J. Biol. Chem. 255:8907-8913.

Bernatzky, R.; Tanksley, S.D. 1986a. Majority of random cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome. Mol. Gen. Genet. 203:8-14.

Bernatzky, R.; Tanksley, S.D. 1986b. Toward a saturated linkage map in tomato, based on isozymes and random cDNA sequences. Genetics 112:887-898.

Birnboim, H.C.; Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7:1513-1523.

Boronat, A.; Martinez, M.C.; Reina, M.; Puigdomènech, P.; Polau, J. 1986. Isolation and sequencing of a 28 kD glutelin-2 gene from maize. Common elements in the 5' flanking regions among zein and glutelin genes. Plant Sci. 47:95-102.

Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphisms. Am. J. Human Genet. 32:314-331.

Chlan, C.A.; Pyle, J.B.; Legocki, A.B.; Dure, L. III. 1986. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XVIII: cDNA and amino acid sequences of members of the storage protein families. Plant Mol. Biol. 7:475-489.

Choi, J.H.; Liu, L.-S.; Borkird, C.; Sung, Z.R. 1987. Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:1906-1910.

Chrispeels, M.J.; Vitale, A.; Staswick, P. 1984. Gene expression and synthesis of phytohemaglutinin in the embryonic axes of developing *Phaseolus vulgaris* seeds. Plant Physiol. 76:791-796.

Collinge, D.B.; Slusarenko, A.J. 1987. Plant gene expression in response to pathogens. Plant Mol. Biol. 9:389-410.

Commere, B.; Vidal, J.; Suzuki, A.; Gadal, P.; Caboche, M. 1986. Detection of the messenger RNA encoding for the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. Plant Physiol. 80:859-862.

Datta, K.; Parker, H.; Averyhart-Fullard, V.; Schmidt, A.; Marcus, A. 1987. Gene expression in the soybean seed axis during germination and early seedling growth. Planta 170:209-216.

Davis, M.M.; Cohen, D.I.; Nielsen, E.A.; Steinmitz, M.; Paul, W.E.; Hood, L. 1984. Cell-type specific cDNA probes and the murine I region. The localization and orientation of $A^d\alpha$. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2194-2198.

Davis, L.G.; Dibner, M.D.; Battey, J.F. 1986. Basic methods in molecular biology. Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, NY. pp. 136-138.

Deininger, P.L. 1987. Full-length cDNA clones: vector-primed cDNA synthesis. Pages 371-389 *in* Berger, S.L.; Kimmel, A.R., eds. Methods in Enzymology, Vol. 152: Guide to molecular cloning techniques. Academic Press.

Della Penna, D.; Kates, D.S.; Bennett, A.B. 1987. Polygalacturonase gene expression in Rutgers, rin, nor, and Nr tomato fruits. Plant Physiol. 85:502-507.

DeVerno, L.L.; Byrne, J.R.; Pitel, J.A.; Cheliak, W.M. 1989. Création d'une banque génomique pour les conifères : un guide de base. Forêts Canada, Rapport d'information PI-X-88F.

Dietrich, G.; Detschey, S.; Neuhaus, H.; Link, G. 1987. Temporal and light control of plastid transcript levels for proteins involved in photosynthesis during mustard (*Sinapis alba* L.) seedling development. Planta 172:393-399.

Dietrich, R.A.; Maslyar, D.J.; Heupel, R.C.; Harada, J.J. 1989. Spatial patterns of gene expression in *Brassica*

napus seedlings: identification of a cortex-specific gene and localization of mRNAs encoding isocitrate lyase and a polypeptide homologous to proteinases. The Plant Cell 1:73-80.

Dolferus, R.; Marbaix, G.; Jacobs, M. 1985. Alcohol dehydrogenase in *Arabidopsis*: analysis of the induction phenomenon in plantlets and tissue cultures. Mol. Gen. Genet. 199:256-264.

Domoney, C.; Casey, R. 1987. Changes in legumin messenger RNAs throughout seed development in *Pisum sativum* L. Planta 170:562-566.

Dure, L. III. 1985. Embryogenesis and gene expression during seed formation. Pages 179-197 *in* Miflin, B.J., ed. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, Vol. 2. Oxford University Press.

Eschenfeldt, W.H.; Berger, S.L. 1987. Purification of large double-stranded cDNA fragments. Pages 335-337 *in* Berger, S.L.; Kimmel, A.R., eds. Methods in Enzymology, Vol. 152: Guide to molecular cloning techniques. Academic Press.

Evola, S.V.; Burr, F.A.; Burr, B. 1986. The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. Theor. Appl. Genet. 71:765-771.

Feinberg, A.P.; Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132:6-13.

Fourney, R.M.; Miyakoshi, J.; Day, R.S. III; Paterson, M.C. 1988. Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. Focus, Bethesda Research Labs. 10:5-7.

Galau, G.A.; Dure, L. III. 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by reciprocal heterologous complementary deoxyribonucleic acid-messenger ribonucleic acid hybridization. Biochem. 20:4169-4178.

Gantt, J.S.; Key, J.L. 1985. Coordinate expression of ribosomal protein mRNAs following auxin treatment of soybean hypocotyls. J. Biol. Chem. 260:6175-6181.

Ghosh, B.; Chaudhuri, M.M. 1984. Ribonucleic acid breakdown and loss of protein synthetic capacity with loss of viability of rice embryos (*Oryza sativa*). Seed Sci. Technol. 12:669-677.

Goldberg, R.B.; Barker, S.J.; Perez-Grau, L. 1989. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. Cell 56:149-160.

Grandbastien, M.A.; Berry-Lowe, S.; Shirley, B.W.; Meagher, R.B. 1986. Two soybean ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit genes share extensive homology even in distant flanking sequences. Plant Mol. Biol. 7:451-465.

Gubler, U. 1987. Second-strand cDNA synthesis: mRNA fragments as primers. Pages 330-335 *in* Berger, S.L.; Kimmel, A.R., eds. Methods in Enzymology, Vol. 152. Academic Press.

Guilfoyle, T.; Hagen, G. 1987. Transcriptional regulation of auxin responsive genes. Pages 85-95 *in* Fox, J.E.; Jacobs, M., eds. Molecular Biology of Plant Growth Control. Alan R. Liss Inc., New York.

Guy, C.L.; Niemi, K.J.; Brambl, R. 1985. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:3673-3677.

Hagen, G.; Kleinschmidt, A.; Guilfoyle, T. 1984. Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. Planta 162:147-153.

Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. 1985. Rapid induction of selective transcription by auxins. Mol. Cell. Biol. 5:1197-1203.

Hagen, G. 1987. The control of gene expression by auxin. Pages 149-163 *in* Davies, P.J., ed. Plant hormones and their role in plant growth and development. Martinus Nijhoff.

Hahne, G.; Mayer, J.E.; Lörz, H. 1988. Embryonic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. Plant Sci. 55:267-279.

Harada, J.J.; DeLisle, A.J.; Baden, C.S.; Crouch, M.L. 1989. Unusual sequence of an abscisic acid-inducible mRNA which accumulates late in *Brassica napus* seed development. Plant Mol. Biol. 12:395-401.

Helentjaris, T.; Gesteland, R. 1983. Evaluation of random cDNA clones as probes for human restriction fragment polymorphism. J. Mol. Appl. Genet. 2:237-247.

Helentjaris, T.; Slocum, M.; Wright, S.; Schaefer, A.; Nienhuis, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet. 72:761-769.

Helentjaris, T.; Weber, D.; Wright, S. 1988. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. Genetics 118:353-363.

Hiesel, R.; Brennicke, A. 1987. cDNA cloning of mitochondrial transcripts from *Oenothera*. Plant Sci. 51:225-230.

Hughes, D.W.; Galau, G. 1988. Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. Plant Mol. Biol. Reporter 64: 253-257.

Hutchison, K.W.; Singer, P.B.; Greenwood, M.S. 1988. Molecular genetic analysis of development and maturation in larch. Pages 26-33 *in* Cheliak, W.M.; Yapa, A.C. eds. Proceedings, Second IUFRO Working Party on Molecular Genetics. Molecular genetics of forest trees. Can. For. Serv. Inf. Rep. PI-X-82.

Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Reporter 5:387-405.

Kenny, J.R.; Dancik, B.P.; Florence, L.Z. 1988. Nucleotide sequence of the carboxy-terminal portion of a lodgepole pine actin gene. Can. J. For. Res. 18:1595-1602.

Key, J.L. 1987. Auxin-regulated gene expression: a historical perspective and current status. Pages 1-21 *in* Fox, J.E.; Jacobs, M., eds. Molecular biology of plant growth control. Alan R. Liss Inc., New York.

Koshiba, T.; Tomura, H.; Miura, M. 1986. Changes in mRNA of *Vigna mungo* cotyledons during seed germination. Plant Cell Physiol. 27:1069-1080.

Kreis, M.; Williamson, M.S.; Forde, J.; Schmitz, D.; Clark, J.; Buxton, B.; Pywell, J.; Marris, C.; Henderson, J.; Harris, N.; Shewry, P.R.; Forde, B.G.; Miflin, B.J. 1986. Differential gene expression in the developing barley endosperm. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 314:355-365.

Krug, M.S.; Berger. S.L. 1987. First-strand cDNA synthesis primed with oligo (dT). Pages 316-325 *in* Berger, S.L.; Kimmel, A.R., eds. Methods in Enzymology, Vol. 152. Academic Press.

Landry, B.S.; Michelmore, R.W. 1987. Methods and applications of restriction fragment length polymorphism analysis to plants. Pages 25-44 *in* Tailoring genes for crop improvement. Plenum Press, New York.

Landry, B.S.; Kesseli, R.; Leung, H.; Michelmore, R.W. 1987a. Comparison of restriction endonucleases and sources of probes for their efficiency in detecting restriction fragment length polymorphisms in lettuce (*Lactuca sativa* L.) Theor. Appl. Genet. 74:646-653.

Landry, B.S.; Kesseli, R.V.; Farrara, B.; Michelmore, R.W. 1987b. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance, and morphological markers. Genetics 116:331-337.

Laroche-Raynal, M; Aspart, L.; Delseny, M.; Penon, P. 1984. Characterization of radish mRNA at three developmental stages. Plant Sci. Lett. 35:139-146.

Lay-Yee, M.; Sachs, R.M.; Reid, M.S. 1987. Changes in cotyledon mRNA during floral induction of *Pharbitis nil* CV. Violet. Planta 171:104-109.

Logemann, J.; Schell, J.; Willmitzer, L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal. Biochem. 163:16-20.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. 1982. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Martin, C.; Northcote, D.H. 1981. Qualitative and quantitative changes in mRNA of castor beans during the initial stages of germination. Planta 151:189-197.

Matsuoka, M.; Yamamoto, N.; Kano-Murakami, Y.; Tanaka, Y.; Ozeki, Y.; Hirano, H.; Kagawa, H.; Oshima, M.; Ohashi, Y. 1987. Classification and structural comparison of full-length cDNA's for pathogenesis-related proteins. Plant Physiol. 85:942-946.

Maunders, M.J.; Holdsworth, M.J.; Slater, A.; Knapp, J.E.; Bird, C.R.; Schuch, W.; Grierson, D. 1987. Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. Plant Cell Environ. 10:177-184.

Mohapatra, S.S.; Poole, R.J.; Dhindsa, R.S. 1987. Changes in protein patterns and translatable messenger RNA populations during cold acclimation of alfalfa. Plant Physiol. 84:1172-1176.

Morgens, P.H.; Pyle, J.B.; Callahan, A.M. 1987. Searching for molecular mechanisms involved in fruit ripening. Pages 157-166 *in* Fox, J.E.; Jacobs, M., eds. Molecular biology of plant growth control. Alan R. Liss Inc., New York

Mozer, T.J. 1980. Partial purification and characterization of the mRNA for α-amylase from barley aleurone layers. Plant Physiol. 65:834-837.

Mundy, J.; Brandt, A.; Fincher. G.B. 1985. Messenger RNAs from the scutellum and aleurone of germinating barley encode (1→3, 1→4)-β-D-glucanase, α-amylase and carboxypeptidase. Plant Physiol. 79:867-871.

Okayama, H.; Berg, P. 1982. High efficiency cloning of full-length cDNA. Mol. Cell. Biol. 2:161-170.

Osborn, T.C.; Alexander, D.C.; Forbes, J.F. 1987. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. Theor. Appl. Genet. 73:350-356.

Ostrem, J.A.; Olson, S.W.; Schmitt, J.M.; Bohnert, H.J. 1987. Salt stress increases the level of translatable mRNA for phosphoenolpyruvate carboxylase in *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol. 84:1270-1275.

Palazzolo, M.J.; Meyerowitz, E.M. 1987. A family of lambda phage cDNA cloning vectors, λSWAJ, allo-

wing the amplification of RNA sequences. Gene 52:197-206.

Parish, J.H.; Kirby, K.S. 1966. Reagents which reduce interactions between ribosomal RNA and rapidly labelled RNA from rat liver. Biochim. Biophys. Acta 129:554-562.

Peña-Cortes, H.; Sanchez-Serrano, J.; Rocha-Sosa, M.; Willmitzer, L. 1988. Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. Planta 174:84-89.

Piechulla, B.; Pichersky, E.; Cashmore, A.R.; Gruissem, W. 1986. Expression of nuclear and plastid genes for photosynthesis-specific proteins during tomato fruit development and ripening. Plant Mol. Biol. 7:367-376.

Piechulla, B.; Gruissem, W. 1987. Plastid and nuclear gene expression during tomato fruit development and ripening. Pages 167-176 *in* Fox, J.E.; Jacobs, M., eds. Molecular biology of plant growth control. Alan R. Liss. Inc., New York.

Pitel, J.A.; Cheliak, W.M. 1986. Enzyme activities during imbibition and germination of seeds of tamarack (*Larix laricina*). Physiol. Plant. 67:562-569.

Pitel, J.A.; Cheliak, W.M. 1988a. Metabolism of enzymes with imbibition and germination of seeds of jack pine (*Pinus banksiana*). Can. J. Bot. 66:542-547.

Pitel, J.A.; Cheliak, W.M. 1988b. Cloning cDNA of conifer seeds. Pages 1-8 *in* Cheliak, W.M.; Yapa, A.C., eds. Proc. Second IUFRO Working Party on Molecular Genetics, Molecular genetics of forest trees. Can. For. Serv. Inf. Rep. PI-X-82.

Reeves, C.D.; Krishnan, H.B.; Okita, T.W. 1986. Gene expression in developing wheat endosperm. Accumulation of gliadin and ADP glucose pyrophosphorylase messenger RNAs and polypeptides. Plant Physiol. 82:34-40.

Rosenthal, N. 1987. Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. Pages 704-720 *in* Berger, S.L.; Kimmel, A.R., eds. Methods in Enzymology, Vol. 152. Academic Press Inc., New York.

Sachs, M.M.; Ho, T.-H.D. 1986. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 37:363-376.

Sargent, T.D. 1987. Isolation of differentially expressed genes. Pages 423-432 *in* Berger, S.L.; Kimmel, A.R., eds. Methods in Enzymology, Vol. 152, Guide to molecular cloning techniques. Academic Press Inc., New York.

Sharma, R.; Schopfer, P. 1987. Phytochrome-mediated regulation of β-amylase mRNA level in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. Planta 171:313-320.

Silhavy, T.J.; Berman, M.L.; Enquist, L.W. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Smith, C.J.S.; Slater, A.; Grierson, D. 1986. Rapid appearance of an mRNA correlated with ethylene synthesis encoding a protein of molecular weight 35,000. Planta 168:94-100.

Suzuki, Y.; Minamikawa, T. 1985. On the role of stored mRNA in protein synthesis in embryonic axes of germinating *Vigna unguiculata* seeds. Plant Physiol. 79:327-331.

Tanksley, S.D.; Hewitt, J. 1988. Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato – a reexamination. Theor. Appl. Genet. 75:811-823.

Tercé-Laforgue, T.; Sallantin, M.; Pernollet, J.-C. 1987. Wheat endosperm mRNA and polysomes and their *in vitro* translation products during development and early stages of germination. Physiol. Plant. 69:105-112.

Theologis, A.; Huynh, T.V.; Davis, R.W. 1985. Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. J. Mol. Biol. 183:53-68.

Titlgen, J.; Hermans, J.; Steppuhn, J.; Jansen, T.; Jansson, C.; Andersson, B.; Nechushtai, R.; Nelson, N.; Herrmann, R.G. 1986. Isolation of cDNA clones for fourteen nuclear-encoded thylakoid membrane proteins. Mol. Gen. Genet. 204:258-265.

Walker, J.C.; Key, J.L. 1982. Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly(A)$^+$ RNAs of elongating soybean hypocotyl. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:7185-7189.

Walker, J.M., ed. 1984. Methods in molecular biology. Vol. 2: Nucleic acids. The Humana Press Inc.

Walker, J.C.; Legocka, J.; Edelman, L.; Key, J.L. 1985. An analysis of growth regulator interactions and gene expression during auxin-induced cell elongation using cloned complementary DNAs to auxin-responsive messenger RNAs. Plant Physiol. 77:847-850.

Wallace, D.M. 1987. Large- and small-scale phenol extractions. Pages 33-41 *in* Berger, S.L.; Kimmel, A.R., eds. Methods in Enzymology, Vol. 152. Academic Press Inc.

Walling, L.; Drews, G.N.; Goldberg, R.B. 1986. Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seed protein mRNA levels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2123-2127.

Whitmore, F.W.; Kreibel, H.B. 1987. Expression of a gene in *Pinus strobus* ovules associated with fertilization and early embryo development. Can. J. For. Res. 17:408-412.

Wiegand, R.C.; Shah, D.M.; Mozer, T.J.; Harding, E.I.; Diaz-Collier, J.; Saunders, C.; Jaworski, E.G.; Tiemeier, D.C. 1986. Messenger RNA encoding a glutathione-S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment. Plant Mol. Biol. 7:235-243.

Wu, R.; Wu, T.; Ray, A. 1987. Adaptors, linkers, and methylation. Pages 343-349 *in* Berger, S.L.; Kimmel, A.R., eds. Methods in Enzymology, Vol. 152. Academic Press Inc.

Yamamoto, N. 1982. Preformed mRNA and light-induced germination of pine (*Pinus thunbergii*) seed. Plant Cell Physiol. 23:865-869.

Zurfluh, L.L.; Guilfoyle, T.J. 1982. Auxin-induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating sections of soybean hypocotyl. Plant Physiol. 69:332-337.

Annexe I.

Solutions mères

Acétate d'ammonium 4M

Ajouter 308,3 g d'acétate d'ammonium à 800 mL de H_2O. Porter le volume à 1 L. Stériliser par filtration et garder à 4°C.

Ampicilline

La solution mère est une solution de 25 mg/mL du sel sodique d'ampicilline dans H_2O. Stériliser par filtration et garder en portions à -20°C.

Pour l'ajouter aux boîtes de Pétri, refroidir à 48°C le milieu sortant de l'autoclave avant d'ajouter une quantité suffisante d'ampicilline pour obtenir une concentration finale de 35-50 µg/mL. Conserver à 4°C de 1 à 2 semaines au maximum avant d'utiliser.

Tampons de liaison pour l'isolement de l'ARNm

Ajouter 0,61 g de Trizma base à 400 mL d'eau
Ajuster le pH à 7,6 avec HCl 1 N
Ajouter 0,17 g d'EDTA et 0,50 g de SDS
Diluer à 500 mL

a) Tampon de liaison 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM; NaCl 0,4 M; SDS 0,1 %).
Ajouter 4,68 g de NaCl à 200 mL du tampon ci-dessus et passer à l'autoclave.

b) Tampon de liaison 2X (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM; NaCl 0,8 M; SDS 0,1 %).
Ajouter 4,68 g de NaCl à 100 mL du tampon ci-dessus et passer à l'autoclave.

c) Tampon d'élution (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM; SDS 0,1 %).
Passer à l'autoclave 200 mL du tampon ci-dessus.

Chloroforme-alcool isoamylique (24:1, v/v)

Dans un grand flacon à bouchon à vis, metre 240 mL de chloroforme et 10 mL d'alcool isoamylique. Mélanger et envelopper le flacon dans une feuille d'aluminium pour le protéger contre la lumière. Conserver hermétiquement fermé à la température ambiante.

DEAE-cellulose (Whatman) DE52

Mettre 100 g de DE52 dans un gobelet et ajouter lentement plusieurs volumes de HCl 0,05 N jusqu'à ce que le pH soit inférieur à 4,5. En agitant doucement, ajouter lentement du NaOH concentré jusqu'à l'obtention d'un pH d'environ 7,5. Laisser sédimenter la résine, décanter le surnageant et laver la résine à plusieurs reprises avec du bouillon L (remettre la résine en suspension dans deux volumes de bouillon L, sédimenter et décanter, jusqu'à ce que le pH du surnageant soit de 7,5). Remettre en suspension pour obtenir une pâte d'environ 75 % de résine et de 25 % de bouillon L. Ajouter de l'azoture de sodium pour obtenir une concentration de 0,1 % et garder à 4°C.

Solution dénaturante

NaCl	86,7 g
NaOH	20,0 g (ajouter à H_2O avec précaution)
H_2O	q. suff. pour 1 L

Denhardt 50X

Ficoll 400	1 g
polyvinylpyrrolidone	1 g

BSA	1 g
H_2O	q. suff. pour 100 mL

EDTA 0,25 M

Ajouter 93,1 g de $Na_2EDTA.2H_2O$ à 800 mL de H_2O. Mélanger en remuant et ajuster le pH à 8 avec du NaOH Porter le volume à 1 litre. Séparer en portions et passer à l'autoclave.

Bromure d'éthidium

Solution mère de 25 mg/50 mL (garder à 4°C à l'abri de la lumière).
Utiliser dans des proportions de 1 pour 1000 dans les mélanges de tampons pour gel avant de verser le gel.
(Porter des gants et manipuler avec soin car c'est un agent mutagène).
Ce produit est également offert en solution (Sigma) ou en pastilles.

Formamide désionisée

Ajouter 50 mL de formamide à 5 g de résine à lits mélangés AG 501-XB de 20 à 50 unités de taille de particule («mesh»), complètement régénérée (Bio-Rad Laboratories). Mélanger en remuant doucement à 4°C pendant 1 h, puis filtrer à deux reprises à travers un papier filtre Whatman no. 1. Stériliser ensuite la formamide par filtration et garder sous forme de petites portions à -20°C. Cette méthode élimine les traces de sel et les produits d'hydrolyse.

Tampon pour l'électrophorèse de l'ADN

1)

0,25 % de bleu de bromophénol
0,25 % de xylène cyanol
40 % (p/v) de sucrose dans H_2O ou 30 % de glycérol dans H_2O
Conserver en petites portions à 4°C

2)

0,25 % de bleu de bromophénol
40 % (p/v) de sucrose dans H_2O
Conserver en petites portions à 4°C

HCl, 1 N

Si l'agent de réaction est concentré à 12 N, il faut 82,5 mL pour préparer 1 L d'une solution 1 N. Remarque : ajouter l'acide à l'eau.

IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside)

Dissourdre 25 mg dans 500 µL de H_2O stérile et désionisé. Garder à -20°C. Utiliser 10 µL par boîte de Pétri de 9 cm.

KCl, 2 M

Dissoudre 14,9 de KCl dans 80 mL de H_2O. Diluer à 100 mL. Ajouter 50 µL de DEPC et passer à l'autoclave.

Milieu L (LB, Luria-Bertani)

	par litre
tryptone Bacto	10 g
levure Bacto	5 g
NaCl	10 g

Dissoudre dans 800 mL de H_2O. Ajuster le pH à 7 et porter à 1 L. Mettre dans de grandes fioles à bouchon à vis. Passer à l'autoclave.

Boîtes de gélose L

	par litre
tryptone Bacto	10 g
levure Bacto	5 g
NaCl	10 g
gélose Bacto	15 g

Dissoudre dans 800 mL de H_2O. Ajuster le pH à 7 et le volume à 1 L. Passer à l'autoclave, mélanger et refroidir à 50°C avant de verser dans les boîtes (~25 mL). Laisser prendre le gel pendant environ 1 h, inverser et garder à 4°C ou à la température ambiante dans des sacs en plastique. Sécher brièvement chaque boîte avant de l'utiliser en la plaçant à 37°C, en position inversée et le couvercle enlevé.

Gélose molle L

	par litre
tryptone Bacto	10 g
levure Bacto	5 g
NaCl	5 g
$MgSO_4$	2,5 g
gélose Bacto	10 g

Dissoudre dans 800 mL de H_2O, ajuster le pH à 7 et le volume à 1 L. Passer à l'autoclave, mélanger et garder à la température ambiante ou à 50°C. N'utiliser que lorsque refroidi à 45-50°C. On utilise de l'agarose au lieu de la gélose Bacto pour les études de prélèvement dans les boîtes.

LiCl, 2 M

Dissoudre 8,48 g de LiCl dans 80 mL de H_2O. Diluer à 100 mL. Ajoute 50 µL de DEPC et passer à l'autoclave.

LiCl, 10 M

Dissoudre 21,2 g de LiCl dans 40 mL de H_2O. Diluer à 50 mL. Ajouter 25 µL de DEPC et passer à l'autoclave.

Maltose

maltose	20 g
H_2O	q. suff. pour 100 mL

Stériliser par filtration. Ajouter 1 mL par 100 mL de milieu.

Tampon NETS

NaCl	0,1 M
Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
EDTA	0,1 mM
SDS	0,1 %

Solution neutralisante

NaCl	87,7 g
1 M Tris-HCl (pH 7)	500 mL

Dissoudre d'abord dans 800 mL de H_2O, puis porter le volume à 1 L.

Bouillon NZY (par litre)

NaCl	5 g
$MgSO_4.H_2O$	2 g
Extrait de levure	5 g

Amine NZ (hydrolysat de caséine) 10 g
Passer à l'autoclave.

Boîtes NZY

Ajouter 15 g de gélose Difco à 1 litre de bouillon NZY. Passer à l'autoclave et couler.

Gélose molle NZY

0,7 % d'agarose dans un bouillon NZY
Passer à l'autoclave.

Phénol

Utiliser du phénol de haute qualité. Pour saturer le phénol de tampon TE, mélanger du tampon TE et du phénol dans une proportion 1:1. Éliminer la phase aqueuse supérieure et ajouter, comme antioxydant, une quantité suffisante de 8-hydroxyquinoléine au phénol pour obtenir une concentration de 0,1 %. Ce phénol est utilisé dans les études sur l'ADNc.

Dans les études où l'on doit extraire l'ARN, faire fondre le phénol après l'avoir conservé à -20°C et ajouter la 8-hydroxyquinoléine (0,1 % p/v). Extraire ensuite le phénol à plusieurs reprises avec un volume égal de Tris 1,0 M (pH 8,0), puis de Tris 0,1 M (pH 8,0) et de mercaptoéthanol à 0,2 % jusqu'à ce que le pH de la phase aqueuse soit égal à 7,6. Le phénol peut être gardé à 4°C jusqu'à 1 mois.

Acétate de potassium, 3 M

Dissoudre 7,36 g d'acétate de K dans 15 mL de H_2O. Ajuster le pH à 5,5 avec de l'acide acétique. Diluer à 25 mL, ajouter 12,5 µL de DEPC et passer à l'autoclave.

SDS, 10 %

Faire une solution à 10 % (p/v), chauffer à 68°C pour faciliter la dissolution et ajuster le pH à 7,2 avec HCl. Séparer en portions.

Sephadex G50

Ajouter lentement 30 g de Sephadex G50 (porosité moyenne) à 250 mL de tampon TE (pH 8,0) renfermant NaCl 0,1 M dans un gobelet ou un flacon de 500 mL. S'assurer que la poudre est bien dispersée. Laisser reposer jusqu'au lendemain à la température ambiante ou chauffer à 65°C pendant 1-2 h, ou passer à l'autoclave pendant 15 mir. Laisser refroidir à la température ambiante. Décanter le surnageant et remplacer par un volume égal de tampon. Conserver à 4°C dans un flacon avec bouchon à vis.

Tampon SM (par litre)

NaCl	5,8 g
$MgSO_4.7H_2O$	2,0 g
Tris-HCl 1 M (pH 7,5)	50 mL
Gélatine à 2 %	5 mL

Dissoudre dans 800 mL de H_2O. Ajuster le volume à 1 L et passer à l'autoclave.

Acétate de sodium, 3 M

Dissoudre 408 g d'acétate de sodium.$3H_2O$ dans 800 mL de H_2O. Ajuster le pH à 5,2 avec de l'acide acétique glacial. Porter le volume à 1 litre. Séparer en portions et stériliser en passant à l'autoclave.

SSC 20 X conc.

NaCl	175,3 g
Citrate trisodique	88,2 g

Dissoudre dans 800 mL de H_2O, ajuster le pH à 7 avec du NaOH et porter le volume à 1 L.

Tampon STE

NaCl 100 mM	5,84 g/L
Tris 10 mM	1,21 g/L
EDTA.$2H_2O$ 1 mM	0,372 g/L

Ajuster le pH à 7,5 avec HCl et passer à l'autoclave

Tampon pour ADN ligase de T4 (5 X)

Tris 250 mM (pH 7,8)
$MgCl_2$ 50 mM
DTT 100 mM
ATP 5 mM
BSA 250 µg/mL

Tampon TAE, 40 X conc.

Tris	193,6 g
Acétate de Na.$3H_2O$	108,9 g
$Na_2EDTA.2H_2O$	15,2 g

Ajuster le pH à 7,2 avec de l'acide acétique et porter le volume final à 1 L avec H_2O.

Milieu TB (bouillon tryptone, milieu lambda)

Le glucose présent dans l'extrait de levure du milieu LB inhibe la synthèse de la protéine du récepteur du phage lambda située à la surface de la cellule. Avec certains phages lambda mutants, il faut donc utiliser des boîtes TB.

	par litre
Tryptone Bacto (Difco)	10 g
NaCl	5 g
Gélose (Difco)	11 g si coulé dans des boîtes de Pétri; 8 g pour la gélose molle

Après le passage à l'autoclave, ajouter 10 mL de $MgSO_4$ 1 M

Tampon TBE (solution mère 10 X)

108 g de Tris base
55 g d'acide borique
9,3 g de $Na_2EDTA.2H_2O$
On obtient une solution mère de pH 8,3. Porter le volume à 1 L avec H_2O désionisé.

Tampon TE

Tris	1,21 g
EDTA.$2H_2O$	0,37 g
H_2O	q. suff. pour 1 L

Ajuster le pH à 7,5 avec HCl et passer à l'autoclave.

Tétracycline

La solution mère renferme 12,5 mg de chlorhydrate de tétracycline par mL d'éthanol à 50 % (v/v) dans l'eau. Stériliser par filtration et conserver à -20°C à l'abri de la lumière.

Pour l'ajouter aux boîtes de Pétri, refroidir le milieu LB passé à l'autoclave à 48°C avant d'ajouter une quantité suffisante de tétracycline pour obtenir une concentration de 12,5 à 15,0 µg/mL. Conserver les boîtes à 4°C à l'abri de la lumière.

Tampon de transcription (5 X conc.)

Tris-HCl	200 mM
$MgCl_2$	30 mM

spermidine	10 mM
NaCl	50 mM

Titre à pH 7,9 à la température ambiante jusqu'à l'obtention d'un pH de 7,5 après dilution à 37°C.

Tris, 1 M (pH 8,0)

Dissoudre 121,1 g de Tris base dans 800 mL de H_2O. Ajuste le pH à 8 avec HCl (environ 42 mL). Porter le volume à 1 L.

Ce tampon présente certains inconvénients : chélation de certains ions; coefficient de température élevé, de sorte qu'il est nécessaire de vérifier le pH lorsqu'on refroidit ou chauffe ce tampon préparé à la température ambiante; le pH varie également de façon considérable avec la concentration.

Eau distillée

L'eau distillée au laboratoire doit d'abord être passée à travers une colonne échangeuse d'ions pour éliminer les impuretés, comme les amines aromatiques qui peuvent demeurer dans l'eau même après distillation. Il faut utiliser une canalisation en verre et non en tygon pour l'eau distillée car le tygon peut libérer des composés dans l'eau. Il faut également utiliser des robinets en téflon et non des robinets graissés. Pour les expériences critiques, on peut se procurer de l'eau de qualité HPLC (par exemple Fisher Scientific).

X gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)

Dissoudre X gal au 50 mg/500 µL dans N,N-diméthylformamide dans un flacon en verre. Garder à -20°C à l'abri de la lumière. Utiliser 25 µL par boîte de Pétri de 9 cm. Dans le cas des études faisant appel au système lambda ZAP, il faut des concentrations plus élevées.

Bouillon YT

NaCl	5 g
Extrait de levure	5 g
Tryptone Bacto	8 g
H_2O	q. suff. pour 1 L

Annexe II.

Fournisseurs choisis de produits chimiques, de cellules et de vecteurs

Adresse	*Types de produits*
Aldrich Chemical Co. P.O. Box 212, Station A Windsor (Ontario) N9A 6K1 (800) 558-9160 *États-Unis :* Aldrich Chemical Co., Inc. 940 West Saint Paul Avenue Milwaukee, WI 53233 (800) 558-9160/(414) 273-3850	Produits chimiques généraux et produits rares.
American Type Culture Collection (ATCC) 12301 Parklawn Drive Rockville, MD 20852 U.S.A.	Organisme qui isole, recueille et distribue des cultures de microorganismes vivants, de même que des cellules humaines et animales.
Amersham Canada Limited 505 Iroquois Shore Road Oakville (Ontario) L6H 2R3 (416) 842-2720/(800) 268-5061 (À l'extérieur de l'Ontario et du Québec) (800) 387-4060 (Ontario, Québec) *États-Unis :* Amersham Corporation 2636 South Clearbrook Drive Arlington Heights, IL 60005 (312) 364-7100/(800) 323-9750	Systèmes de clonage (ADNc, M13), systèmes de traduction, enzymes, produits chimiques marqués par des radioisotopes, «Hybond mAP» pour l'isolement de poly $(A)^+$.
AMRESCO (American Research Products Company) P.O. Box 39098 30175 Solon Industrial Parkway Solon, OH 44139 (800) 448-4442	Produits chimiques utilisés en biotechnologie.
Anachemia Canada, Inc. C.P./P.O. 147 Lachine Montréal (Québec) H8S 4A7 (514) 489-5711/(800) 361-0209 (416) 279-5122 (Toronto) *États-Unis :* Anachemia Chemicals Inc. P.O. Box 783 Champlain, NY 12919 (513) 298-4444/(800) 323-1414	Réactifs d'usage général et ceux qui sont utilisés en biotechnologie.

Adresse	*Types de produits*
BDH Chemicals 350 Evans Avenue Toronto (Ontario) M8Z 1K5 (416) 255-8521/(800) 268-2129	Produits chimiques généraux, produits pour milieux de culture «Difco», par exemple tryptone, extrait de levure.
Beckman Inc. 2500 Harbor Boulevard Fullerton, CA 92634 U.S.A.	Enzymes et réactifs, anticorps.
Bio/Can Scientific Inc. (Promega) Fournisseur canadien : voir *Fisher Scientific*	Systèmes de transcription, de séquençage, de clonage, de traduction et d'électrophorèse; enzymes; produits «Ultra-pure» pour la biotechnologie. Également fournisseurs des produits «B10 101» (systèmes de purification de l'ADN).
États-Unis : Promega 2800 S. Fish Hatchery Road Madison, WI 53711 (608) 274-4330/(800) 356-9526	
Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd. 3140 Universal Drive Mississauga (Ontario) L4X 2C8 (416) 624-0713	Résines échangeuses d'ions, milieux de filtration sur gel, enzymes, vecteurs de clonage, produits immunologiques.
États-Unis : Bio-Rad Laboratories, Inc. 1414 Harbour Way South Richmond, CA 94804 (800) 227-5589/(800) 227-3259 (en Californie)	
Boehringer Mannheim Canada Ltd. 11450, Côte de Liesse Dorval (Québec) H9P 1A9 (514) 636-6760/(800) 361-2070 (Est) (800) 361-6046 (Ouest)	Enzymes, vecteurs de clonage, linkers RE, divers réactifs. Kits de marquage et de détection d'ADN non radioactif.
États-Unis : Boehringer Mannheim Biochemicals 7941 Castleway Drive Indianapolis, IN 46250 U.S.A.	
BRL (voir GIBCO/BRL)	

Adresse	*Types de produits*
Calbiochem Corporation P.O. Box 12087 San Diego, CA 92112-4180 (619) 450-9600 (800) 854-3417 U.S.A. (Au Canada, produits distribués par Terochem)	«Miracloth», enzymes, réactifs.
Caledon Laboratories Ltd. 40 Armstrong Avenue Georgetown (Ontario) L7G 4R9 (800) 268-7451/(416) 877-0101	Produits chimiques généraux, distributeurs des produits chimiques GFS.
Canadawide Scientific Ltd. 1230 Old Innes Road, Unité 414 Ottawa (Ontario) K1B 3V3 (613) 741-6197/(800) 267-3787	Produits chimiques généraux, produits pour milieux de culture «Difco», produits Eastman Kodak, J.T. Baker et Nalge.
Canlab AHS Canada Inc. 2390 Argentina Rd. Mississauga (Ontario) L5N 3P1 (416) 821-9660	Produits chimiques généraux, par exemple Mallinckrod, J.T. Baker; produits de laboratoire Difco.
Chemical Dynamics Corporation P.O. Box 395 3001 Hadley Road South Plainfield, NJ 07080 U.S.A. (201) 753-5000	Produits chimiques généraux, résines.
Clontech; dist. dans l'Ouest canadien Sin-Can Inc. 4015 1st Street, SE, #3 Calgary (Alberta) T2G 4X7 (403) 287-2345 *États-Unis :* Clontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way Palo Alto, CA 94303 (800) 662-CLON (à l'extérieur de la Californie) (415) 424-8188	Banques, ARN poly $(A)^+$, vecteurs de clonage et d'expression, systèmes de fusion de gènes GUS, réactifs.
Collaborative Research 128 Spring Street Lexington, MA 02173 U.S.A.	Peptides et produits apparentés aux nucléotides.

Adresse	*Types de produits*
Consolidated Alcohols P.O. Box 372, Terminal A Toronto (Ontario) M5W 1C8	Alcool éthylique absolu.
Cooper Biomedical 1 Technology Court Malvern PA 19355 U.S.A.	Enzymes et anticorps.
Canada : ICN Canada Ltd. 1956, rue Bourdon Montréal (Québec) H4M 1V1 (514) 744-6792 (Montréal) (416) 848-2700 (Toronto)	
Diagnostic Chemicals Limited West Royalty Industrial Park Charlottetown (I.-P.-É.) C1E 1B0 (902) 566-1396	Enzymes, produits de chimie fine, par exemple X-Gal.
Difco Laboratories P.O. Box 1058 A Detroit, MI 48232 U.S.A.	Produits chimiques servant à la confection de milieux pour la culture de bactéries.
DuPont Canada Inc., (Produits NEN) 7070 Mississauga Road Box 2200-Streetsville Mississauga (Ontario) L5M 2H3 (416) 821-5001	Membranes «Gene Screen», kit de synthèse d'ADNc, «Nensorb 20» (cartouche de purification des acides nucléiques), vecteurs de clonage, réactifs marqués par des radioisotopes, systèmes de traduction et de séquençage, produits immunologiques.
États-Unis : DuPont Company Biotechnology Systems P.O. Box 80024 Wilmington, DE 19880-0024 U.S.A. (800) 551-2121	
Eastman Kodak Company 343 State Street Rochester, NY 14650 U.S.A. (716) 458-3702	Produits chimiques généraux, produits pour l'électrophorèse, thiocyanate de guanidine, colorants, réactifs de coloration.

Adresse	*Types de produits*
Canada : Produits fournis par Fisher Scientific Co., Limited et Sargent-Welch of Canada, Ltd.	
ESBE Laboratory Supplies 80 McPherson St. Markham (Ontario) L3R 3V6 (416) 498-0575	Distributeurs de produits fabriqués par des compagnies telles Ames, Costar.
Fisher Scientific 112 Colonnade Road Nepean (Ontario) K2E 7L6 (613) 225-6752	Produits chimiques généraux, produits «Fisher Biotech».
États-Unis : Fisher Scientific 711 Forbes Avenue Pittsburgh, PA 15219 (412) 562-8543	
Fluka Chemical Corp. 980 South Second Street Ronkonkoma, NY 11779 U.S.A. (516) 467-0980/(800) 358-5287 (800) 458-5287	Produits chimiques généraux.
Canada Produits distribués par Caledon Laboratories, Terochem	
FMC Bio Products 5 Maple Street Rockland, ME 04841-2994 U.S.A. (800) 341-1574	Agaroses spéciales et «purifiées», ampholytes, produits pour gel d'acrylamide.
Canada Produits fournis par Mandel Scientific Ltd.	
Gentec Inc. 2625, rue Dalton Sainte Foy (Québec) G1P 3S9 (418) 657-8000	

Adresse	*Types de produits*
GIBCO/BRL Canada Life Technologies, Inc. 2270 Industrial Street Burlington (Ontario) L7P 1A1 (416) 335-2255/(800) 2634-6231 *États-Unis :* Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc. P.O. Box 6009 Gaithersburg, Maryland 20877 (800) 638-8992/(301) 840-8000	Vecteurs de clonage, kits de synthèse d'ADNc, enzymes, réactifs, systèmes de traduction et de séquençage, produits immunologiques, système de détection d'acides nucléiques non radioactifs, oligonucléotides (par exemple linkers moléculaires), cellules compétentes congelées, produits «Gibco» (milieux de culture).
ICN Biomedicals, Inc. 3300 Hyland Avenue Costa Mesa, CA 92626 U.S.A. (714) 545-0113 *Canada* ICN Canada Ltd. 1956, rue Bourdon Montréal (Québec) H4M 1V1 (514) 744-6792	Produits chimiques radioactifs, réactifs pour électrophorèse, produits chimiques «ultra-pure», membrane de transfert en nylon (Biotrans).
International Biotechnologies (Canada) Inc. (IBI) 366 Adelaide St., E., Suite 536 Toronto (Ontario) M5A 3X9 (800) 387-1525/(416) 362-8278 (les produits sont maintenant fournis par Terochem) *États-Unis :* International Biotechnologies, Inc. (IBI) P.O. Box 9558 275 Winchester Avenue New Haven, CT 06535 (203) 786-5600/(800) 243-2555	Enzymes, réactifs de séquençage, linkers, vecteurs de clonage, synthèse d'oligonucléotides spécifiques, systèmes spécifiques de clonage et de séquençage.
Invitrogen 11588 Sorrento Valley Rd., Suite 20 San Diego, CA 92121-9776 U.S.A. 1-619-259-4868 Télécopieur : 1-619-259-8683	Système de clonage de banques d'ADNc, kit d'hybridation par soustraction, kit d'isolement d'ARNm.

Adresse	*Types de produits*
Johns Scientific Inc. 175 Hanson Street Toronto (Ontario) M4C 1A7 (416) 699-5555/(800) 268-4410	Distributeurs des réactifs J.T. Baker et de matériel de laboratoire.
LKB Instruments 9319 Gaither Road Gaithersburg, MD 20877 U.S.A. (301) 963-3200	Réactifs pour l'électrophorèse.
Canada : Produits disponibles auprès de Pharmacia (Canada) Inc.	
Mandel Scientific Company Ltd. Hanlon Business Park 2 Admiral Place, R.R. #6 Guelph (Ontario) N1H 6J3 (519) 763-2145	Produits chimiques divers, par exemple cellulose DEAE, produits FMC (agaroses et acrylamides spéciales).
New England Biolabs (NEBL) 32 Tozer Road Beverly, MA 01915-5510 U.S.A. (508) 927-5054	Vecteurs de clonage, enzymes agissant sur l'ADN, amorces, linkers, adaptateurs.
Oxford Laboratories of Canada Ltd. 289 Blakie Road London (Ontario) N6L 1B8 (519) 652-2400	Fournisseur de produits chimiques fabriqués par des compagnies comme J.T. Baker et Eastman Kodak.
Pharmacia (Canada) Inc. 500, Boulevard Morgan Baie D'Urfé (Québec) H9X 3V1 (514) 457-6661/(800) 363-7878 (Québec, Ontario, Maritimes) (800) 363-6877 (T.-N., Ouest canadien)	Agaroses, ampholytes vecteurs, produits de biologie cellulaire, vecteurs de clonage, kit de synthèse d'ADNc, produits immunologiques, oligodésoxynucléotides.
États-Unis : Pharmacia Inc. 800 Centennial Avenue Piscataway, NJ 08854 (201) 457-8000	
Promega (voir Bio/Can Scientific Inc.)	

Adresse	*Types de produits*
Schwarz Mann 56 Rogers Street Cambridge, MA 02142 US.A.	Produits chimiques généraux.
Canada : Produits fournis par Canadian Scientific Products Ltd. P.O. Box 7177 London (Ontario) N5Y 4J9 (519) 473-2277	
Seikagaku America, Inc. 9049 Fourth Street North P.O. Box 21517 St. Petersburg, FL 33724 U.S.A.	Enzymes.
Sigma Chemical Company P.O. Box 14508 St. Louis, MO 63178 U.S.A.	Produits chimiques généraux.
Stratagene 11099 North Torrey Pines Road La Jolla, CA 92037 (800) 424-5444 (commandes) (800) 548-1113 (soutien technique)	Vecteurs de clonage, banques de gènes spécifiques, enzymes, kits de caractérisation de gènes, accessoires pour les travaux faisant appel à des produits radioactifs, «Stratalinker™ UV crosslinker».
Terochem (Est) 2740-A Slough St. Mississauga (Ontario) L4T 1G3 (800) 268-4944/(416) 673-0705 Terochem (Ouest) 5729-92 Street Edmonton (Alberta) T6E 3A4 (800) 661-6431/(403) 438-2222	Produits chimiques généraux; fournisseurs de produits de biotechnologie d'ABN, de Cruachem, de Calbiochem, de Serva et d'IBI.
Toronto Research Chemicals 4483 Chesswood Drive Downsview (Ontario) M3J 9Z9	Produits chimiques généraux; par exemple chlorure de césium.
United States Biochemical Corporation (USB) P.O. Box 22400 Cleveland, OH 44122 U.S.A. (800) 321-9322	Enzymes et réactifs, produits de séquençage de l'ADN.

Adresse	*Types de produits*
Vector Cloning Systems 3770 Tansy Street San Diego, CA 92121 U.S.A.	Vecteurs de clonage, extraits pour encapsidation et souches bactériennes.
Western Scientific Services Ltd. 11620 Horshoe Way Richmond (C.-B.) V7A 4V5 (604) 274-4111	Fournisseurs de produits de Difco Laboratories, Worthington Biochemicals, etc.

Annexe III.

Fournisseurs de matériel et d'équipement

Adresse	*Types de produits*
Aldrich Chemical Co. P.O. Box 212, Station A Windsor (Ontario) N9A 6K1 (800) 558-9160	Équipement divers, par exemple verrerie, blocs chauffants, équipement de sécurité, outils, kits.
États-Unis : Aldrich Chemical Company Inc. 940 West Saint Paul Avenue Milwaukee, WI 53233 U.S.A. (800) 558-9160/(414) 273-3850	
Amicon Canada Ltd. 1226 White Oaks Boulevard Oakville (Ontario) L6H 2B9 (416) 842-2520/(800) 387-4042	Filtration sur membrane, microséparation, systèmes d'ultrafiltration, chromatographie, colonnes.
BDH Inc. 350 Evans Avenue Toronto (Ontario) M8Z 1K5 (416) 255-8521	Distributeurs des produits Kimble et Nagle.
Beckman Instruments (Canada) Inc. 1045 Tristar Drive Mississauga (Ontario) L5T 1W5 (416) 670-1234/(800) 387-6799	Spectrophotomètres, centrifugeuses, produits pour scintillation liquide, pH-mètres, produits chimiques divers.
États-Unis : Beckman Instruments, Inc. Scientific Instruments Division Campus Drive at Jamboree Boulevard Irvine, CA 92713 U.S.A.	
Becton-Dickinson Canada 2464 South Sheridan Way Mississauga (Ontario) L5J 2M8 (416) 822-4820	Seringues.
Biomed Instruments, Inc. 1020 South Raymond Avenue, Suite B Fullerton, CA 92631 U.S.A. (714) 870-0290	Densitomètres à balayage au laser doux.

Adresse	*Types de produits*
Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd. 3140 Universal Drive Mississauga (Ontario) L4X 2C8 (416) 624-0713/(800) 268-0213 *États-Unis :* Bio-Rad Laboratories, Inc. 1414 Harbour Way South Richmond, CA 94804 U.S.A. (415) 232-7000/(800) 227-5589	Équipement et produits de toutes sortes, par exemple électrophorèse, analyse de la séquence de l'ADN, colonnes chromatographiques jetables «Poly-Prep», membranes de transfert «Zeta-Probe», produits immunologiques.
Brinkmann Instruments (Canada) Ltd. 50 Galaxy Blvd. Rexdale (Ontario) M9W 4Y5 (416) 675-7911 *États-Unis :* Brinkmann Instruments Co. Division of Sybron Corporation Cantiague Road Westbury, NY 11590 (800) 645-3050	Homogénéiseur «Polytron», dispositifs de régulation de la température à circulation et bains-marie («Lauda»), pipettes Eppendorf.
BRL (voir GIBCO/BRL)	
Canadawide Scientific Ltd. 1230 Old Innes Road, Unit 414 Ottawa (Ontario) K1B 3V3 (613) 741-6197/(800) 267-3787	Équipement divers, distributeur des produits Thermolyne et du matériel de prélèvement Nasco (par exemple sacs à échantillonnage Whirl-Pak).
Canlab AHS Canada Inc. 2390 Argentina Road Mississauga (Ontario) L5N 3P1 (416) 821-9660	Équipment et fournitures de toutes sortes (par exemple produits de Nalge Co. Inc., Whatman, Sartorius, Eberbach Corp.
Cole-Parmer Instrument Co. 7425 North Oak Park Avenue Chicago, IL 60648 U.S.A. (800) 323-4340 pour le Canada et les États-Unis (312) 647-7600	Équipement divers.
Comeau Technique Ltd. 5605, Vanden Abeele St-Laurent (Québec) H4S 1S1 (514) 334-3165/(800) 361-2553 (Est) (800) 363-2841 (Ouest)	Distributeur des instruments Thomas Scientific, Cole-Parmer, Hanna.

Adresse	*Types de produits*
Costar 205 Broadway Cambridge, MA 02139 U.S.A (800) 492-1110 *Canada :* Produits disponibles auprès de John's Scientific Inc.	Matériel en plastique, par exemple fioles, tubes à centrifuger en polypropylène.
Diamed Lab Supplies Inc. 3069 Universal Dr. Mississauga (Ontario) L4X 2E2 (613) 233-1089/(416) 625-6021 (800) 387-7519	Équipement divers, par exemple blocs d'alimentation, centrifugeuses, agitateurs, microtubes à centrifuger.
DuPont Canada Inc. 7070 Mississauga Rd., Box 2200-Streetsville Mississauga (Ontario) L5M 2H3 (416) 821-5001 *États-Unis :* DuPont Company Biotechnology Systems P.O. Box 80024 Wilmington, DE 19800-0024 (800) 551-2121	Centrifugeuses «Sorval», synthétiseurs d'ADN et de peptides.
Ealing Scientific Ltd. 6010, rue Vanden Abeele St.-Laurent (Québec) H4S 1R9 (514) 335-0792/(800) 361-1905	Distributeurs des produits Harvard : pompes, autoclaves, etc.
Eastman Kodak Company Laboratory and Research Products Division 343 State Street Rochester, NY 14650 U.S.A. (716) 458-3702 *Canada :* Produits disponibles auprès de : Fisher Scientific Co., Limited, et Sargent-Welch Scientific of Canada, Ltd. Aussi : Kodak Canada, Ventes gouvernementales 55, rue Metcalfe, Pièce 270 Ottawa (Ontario) K1P 6L5	Films et cassettes pour rayons-X.

Adresse	*Types de produits*
Eberline Instrument Corp. P.O. Box 2108, Airport Road Santa Fe, NM U.S.A. (505) 471-3232 *Canada :* Safety Supply Canada 214 King Street, East Toronto (Ontario) M5A 1J8 (416) 364-3234	Systèmes de détection des radiations.
E-C Apparatus Corporation 3831 Tyrone Boulevard, North St. Petersburg, FL 33709 U.S.A. (813) 344-1644/(800) 624-2232 *Canada :* Produits disponibles auprès de Mandel Scientific Company Ltd.	Produits pour électrophorèse, densitomètres.
Elkay Products Inc. 800 Boston Turnpike Shrewsbury, MA 01545 U.S.A. (800) LAB-PROD/(508) 845-2116 *Canada :* Produits fournis entre autres par Canlab, Ingram et Bell Scientific	Matériel en plastique, par exemple pipettes de transfert jetables, tubes à centrifuger, embouts de pipette.
Falcon Labware Becton Dickenson Labware 1950 Williams Drive Oxnard, CA 93030 U.S.A. *Canada :* Produits disponibles entre autres auprès de John's Scientific Inc.	Matériel en plastique pour la culture des cellules, par exemple tubes en polypropylène stériles de 16 mL.
Fisher Scientific 112 Colonnade Road Nepean (Ontario) K2E 7L6 (613) 225-6752/(800) 267-1025	Équipement divers : fournisseurs des bains-marie à agitation «Lab-line», des centrifugeuses «IEC», des produits Corning, de la verrerie Nalgene, etc.

Adresse	*Types de produits*
États-Unis : Fisher Scientific 711 Forbes Avenue Pittsburgh, PA 15219 (412) 562-8300	
FTS Systems, Inc. P.O. Box 158 Stone Ridge, NY 12484-0158 (800) 251-1531/(914) 687-0071	Lyophilisateurs.
Gelman Sciences Inc. 2906, rue Diab Montréal (Québec) H4S 1M7 (514) 337-2744/(800) 361-7868 (Est du Canada) (800) 361-6660 (Ouest du Canada)	Systèmes de filtration.
États-Unis : Gelman Sciences 600 Wagner Rd. Ann Arbor, MI 48106 U.S.A.	
GIBCO/BRL Canada Life Technologies Inc. 2270 Industrial Street Burlington (Ontario) L7P 1A1 (416) 335-2255	Systèmes d'électrophorèse (par exemple séquençage), systèmes de transfert d'acides nucléiques, distributeur des produits Bellco Glass.
États-Unis : Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc. P.O. Box 6009 Gaithersburg, MD 20877	
Hoefer Scientific Instruments 654 Minnesota Street, Box 77387 San Francisco, CA 94107 U.S.A. (800) 227-4750/(415) 282-2307 (en Californie)	Systèmes d'électrophorèse, appareils pour fabrication de gradients, densitomètres, etc.
Canada : Technical Marketing Associates 179 Colonnade Road, Pièce 100 Nepean (Ontario) K2E 7J4 (613) 226-8297 (Ottawa) (416) 826-7752 (Toronto)	

Adresse	*Types de produits*
Horizon Environmental 7435 North Oak Park Avenue Chicago, IL 60648 U.S.A. (312) 647-7644	Équipement divers.
Canada : Comeau Technique Ltd. 5605 Vanden Abeele St-Laurent (Québec) H4S 1S1 (514) 334-3165/(800) 361-2553	
Ingram and Bell Scientific 20 Bond Avenue Don Mills (Ontario) M3B 1L9 (416) 443-9647	Équipements de Hitachi, Elkay, Nucleopore, Gen-Probe, Puffer Hubbard, ISS (matériel pour électrophorèse).
Integrated Separation Systems One Westinghouse Plaza Neponset Valley Parkway Hyde Park, MA 02136 U.S.A. (617) 361-5700	Matériel pour électrophorèse.
International Biotechnologies Canada, Inc. (IBI) 366 Adelaide St. E. Suite 536 Toronto (Ontario) M5A 3X9 (800) 387-1525/(416) 362-8278	Systèmes d'électrophorèse, électroéluеur modèle UEA, analyse de séquençage.
États-Unis : International Biotechnologies, Inc. (IBI) P.O. Box 9558 275 Winchester Avenue New Haven, CT 06535 (203) 786-5600/(800) 243-2555	
Isco P.O. Box 5347 Lincoln, NE 68505 U.S.A. (800) 228-4250	Blocs d'alimentation.
John's Scientific Inc. 145, Avenue Bentley, Unité 8 Ottawa (Ontario) K2E 6T7 (613) 727-5630/(800) 268-4410	Équipement divers, par exemple centrifugeuses «MSE», bains-marie avec agitation «Lab-line», spectrophotomètres «Perkin-Elmer», etc.

Adresse	*Types de produits*
Kontes Spruce Street, P.O. Box 729 Vineland, NJ 08360 U.S.A. (800) 223-7150	Fabricants de produits en verre, d'instruments scientifiques et de débitmètres.
Lab-line Instruments Inc. 15th and Bloomingdale Avenues Melrose Park, IL 60160 U.S.A. (312) 450-2600/(800) 323-0257	Bains-marie à agitation à environnement contrôlé, étuves, bains-marie.
Canada : Produits disponibles auprès de : John's Scientific Inc. et Fisher Scientific	
Mandel Scientific Company Ltd., Hanlon Business Park 2 Admiral Place, R.R. #6 Guelph (Ontario) N1H 6J3 (519) 763-2145	Pipettes à volume variable Pipetman™.
Nalgene Labware Department Nalge Company Division of Sybron Corporation Rochester, NY 14602 U.S.A. (716) 586-8800	Matériel en plastique, par exemple boucliers contre les radiations, dispositifs de filtration.
Canada : Produits disponibles auprès de : BDH, Canadawide Scientific, Canlab, Fisher Scientific, John's Scientific	
New Brunswick Scientific Co., Inc. P.O. Box 986 44 Talmadge Road Edison, NJ 08818 U.S.A.	Incubateurs et bains-marie à environnement contrôlé.
Nucleopore Corporation 7035 Commerce Circle Pleasanton, CA 9456-3294 U.S.A.	Produits de filtration.
Canada : Produits disponibles auprès de : Ingram and Bell Scientific 20 Bond Avenue Don Mills (Ontario) M3B 1L9 (416) 443-9647	

Adresse	*Types de produits*
Oxford Laboratories 289 Blakie Rd. London (Ontario) N6L 1B8 (519) 652-2400/(800) 265-3496	Fournisseurs des produits Haake, Lab-line, Falcon, Corning, Schleicher et Schuell, Difco, Whatman, Brinkmann, etc.
Pall Ultrafine Filtration Corporation Glen Cove, NY 11542 U.S.A.	Biodyne (filtres à membrane de nylon).
Canada : ICN Biomedicals Canada Ltd. 1956, rue Bourdon Montréal (Québec) H4M 1X1 (514) 744-4548/(800) 361-9616	
Pegasus Industrial Specialties Ltd. P.O. Box 319 Agincourt (Ontario) M1S 3B9 (416) 298-3141	Verrerie générale et fabriquée sur commande.
Perkin-Elmer, Ltd. 376, Av. Churchill, Pièce 209 Ottawa, Ontario K1Z 5C2 (613) 726-1944	Spectrophotomètres dans l'UV.
États-Unis : Perkin-Elmer Corporation Oak Brook Instrument Division 2000 York Road Oak Brook, IL 60521 (312) 887-0770	
Pharmacia (Canada) Inc. 500, Boulevard Morgan Baie D'Urfé (Québec) H9X 3V1 (514) 457-6661/(800) 363-7878 (Ontario, Québec, Maritimes)	Systèmes d'électrophorèse, par exemple blocs d'alimentation, produits LKB, synthèse d'ADN (Gene Assembler Plus).
États-Unis : Pharmacia Inc. 800 Centennial Avenue Piscataway, NJ 08854 (201) 457-8000	
Polaroid Canada 350 Carlingview Drive Rexdale (Ontario) M9W 5G6	Caméra Polaroid MP-4 Land.

Adresse	*Types de produits*
Sargent-Welch Scientific of Canada Limited 285 Garyray Drive Weston (Ontario) M9L 1P3 (416) 741-5210 *États-Unis :* Sargent-Welch Scientific Company 7300 North Linder Avenue P.O. Box 1026 Skokie, IL 60077 U.S.A. (312) 677-0600	Équipement divers.
Sarstedt Canada, Inc. 5655, Bois-franc St.-Laurent (Québec) H4S 1B2 (514) 337-6908 *États-Unis :* Sarstedt, Inc., Route 1, P.O. Box 4090 Princeton, NJ 08540 (609) 452-1155/(800) 257-5101	Matériel en plastique jetable stérile, par exemple pipettes, tubes à centrifuger.
Savant Instruments, Inc. 110-103 Bi-County Blvd. Farmingdale, NY 11735 U.S.A. (516) 249-4600 *Canada :* Produits disponibles auprès de : Emerson Instruments Inc. 2275 Victoria Park Ave., Suite 205 Scarborough (Ontario) M1R 1W4 (416) 449-8437	Évaporateur-concentrateur «Speed Vac», centrifugeuses, systèmes d'électrophorèse.
Schleicher and Schuell, Inc. 10 Optical Avenue Keene, NH 03431 U.S.A. (603) 352-3810/(800) 245-4024 *Canada :* Produits disponibles auprès de : Mandel Scientific Company Ltd. 143 Dennis Street Rockwood (Ontario) N0B 2K0 (519) 856-9566/(800) 265-8348	Filtres, minicolonnes «Elutip», systèmes «dot-blot», dispositifs de filtration.

Adresse	*Types de produits*
Sigma Chemical Company P.O. Box 14508 St. Louis, MO 63178	Pipette de séquençage, cassettes d'exposition, boucliers en acrylique et récipients.
Terochem 2740-A Slough St. Mississauga (Ontario) L4T 1G3 (416) 673-0705/(800) 268-4944	Équipement divers, par exemple transilluminateur «Camag»; produits Whatman, Socorex, Ika, Tomy et Hughes and Hughes.
Transcat P.O. Box 456, Station "A" Rexdale (Ontario) M9W 5L4 (800) 387-6878	Équipement divers.
Whatman, Inc. 9 Bridewell Place Clifton, NJ 07014 U.S.A.	Papiers filtre.
Canada : Produits disponibles auprès de : Canlab, Fisher Scientific, John's Scientific, Mandel Scientific et Terochem	
Xymotech Biosystems Inc. 8180, Devonshire, Pièce 8 Montréal (Québec) H4P 2K3 (514) 738-1386 (Montréal) (416) 283-2977 (Toronto)	Distributeurs des produits Schleicher et Schuell; par exemple systèmes de gels pré-coulés, systèmes de transfert, systèmes de filtration.